

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS PARAINFLUENZA HUMANO TIPO 4
EN MUESTRAS DE HISOPADO NASOFARÍNGEO DE LOS AÑOS 2011 AL 2019
DE PANAMÁ**

AUTOR:

ADIANEZ HIDALGO

YAILYN MORENO

2024

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS PARAINFLUENZA HUMANO TIPO 4
EN MUESTRAS DE HISPADO NASOFARÍNGEO DE LOS AÑOS 2011 AL 2019**

AUTOR:

ADIANEZ HIDALGO

YAILYN MORENO

DIRECTOR: LEYDA E. ÁBREGO SÁNCHEZ

CONSULTORES:

PROF. ZEUZ CAPITÁN BARRIOS

PROF. FERMÍN MEJÍA

**Trabajo de Graduación para optar por
el Grado Académico de Licenciatura en
Biología con orientación en Microbiología
y Parasitología**

FECHA DE GRADUACIÓN

Panamá, de septiembre__ de 2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre Zenaida Rodríguez, por ser una mujer luchadora, su amor incondicional ha sido la fuerza motriz detrás de cada meta que he logrado en este viaje académico. Mi hermana Ainexy Hidalgo, mis abuelos, Guillermo Rodríguez y Xenia Justiniani, mi tía Gladys Rodríguez y mis primo Guillermo Antonio, Diana Ureña y Dilan Henríquez.

Adianez Hidalgo

Dedico este trabajo a mis padres Martin Moreno y Rosa Vásquez por haberme impulsado siempre a salir adelante en los estudios, por su dedicación, apoyo y amor desde siempre.

A mi abuelito Chito por ser mi ángel y mi mayor inspiración para salir adelante.

A mi hermana Yaimara por apoyarme y estar siempre presente.

A mi tía Niria QEPD por todas sus enseñanzas y su carisma.

A mi tía Kathia QEPD por todo su cariño y apoyo.

A mi Akira y Eros el mejor regalo que he podido tener.

Yailyn Moreno

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios, y a mis familiares por su amor incondicional y apoyo constante. Su comprensión y aliento fueron mi roca durante todo este proceso.

A mi compañera de tesis Yailyn Moreno por acompañe en todo este camino.

Agradezco a la Dra. Leyda Ábrego, por ofrecerme la maravillosa oportunidad de realizar este proyecto, por instruirme, orientarme y brindarme sus conocimientos, al igual que al profesor Zeuz Capitan.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES), al Departamento de Investigación en Virología y Biotecnología, por apoyarme en el uso de laboratorios y equipos necesarios para realizar este proyecto.

Al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF) y al Sistema Nacional de Investigación (SNI) y la Secretaria Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación (SENACYT) por los fondos otorgados para el desarrollo de esta investigación.

"Pues yo sé los planes que tengo para ustedes -Dice el Señor-. Son planes para lo bueno y no para lo malo, para darles un futuro y una esperanza" Jeremías 29:11.

Gracias Dios por el plan que me has dado y el propósito que tengo que cumplir en tu nombre, por siempre acompañarme y darme tu amor.

A mi compañera Adianez Hidalgo por acompañarme en este proceso.

A la Dra. Leyda Ábrego por ser nuestra tutora, por la grandiosa oportunidad de realizar este proyecto, la gratitud de ayudarnos con su amplio conocimiento en todo momento.

Al Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud, al Departamento en Virología y Biotecnología por su grandísimo apoyo para la elaboración de esta tesis en sus instalaciones.

Al profesor Zeuz por la ayuda brindada, por su tiempo y asesorarnos.

Al Ministerio de Economía y Finanzas (MEF) y al Sistema Nacional de Investigación (SNI).

Adianez Hidalgo

Yailyn Moreno

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
Descubrimiento de PIVh-4.....	4
Clasificación taxonómica.....	4
Estructura y Organización Genómica.....	5
Replicación.....	7
Epidemiología.....	8
Estacionalidad.....	12
Patogenicidad.....	12
Diagnóstico.....	13
CAPITULO II: METODOLOGÍA	14
Extracción de ARN.....	14
RT-PCR en un solo paso.....	16
Prueba de RNasa P.....	18

RT-PCR punto final.....	18
Electroforesis.....	20
Secuenciación.....	21
Análisis Filogenético.....	23
CAPÍTULO III: RESULTADOS.....	24
CAPÍTULO IV: DISCUSION.....	34
CONCLUSIÓN.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRAFICAS

Figura 1: Diagrama Esquemático de la Estructura del PIVh-4.....	6
Figura 2: Genoma de PIVh-4A y PIVh-4B con la posición relativa de sus amplicones.....	6
Figura 3: Ciclo de adhesión, fusión y replicación de los PIVh.....	7
Figura 4: Extracción de muestras de hisopado nasofaríngeos.....	14
Figura 5: Kit Comercial de amplificación AgPath-ID™ One-step RT-PCR.....	16
Figura 6: Preparación del mix QIAGEN OneStep.....	20
Figura 7: Preparación del Gel al 1.5% de agarosa.....	20
Figura 8: Colocación del producto de amplificación al gel de electroforesis.....	20
Figura 9: Loading Buffer y marcado de peso molecular (100 Pb).....	21
Figura 10: Secuenciador3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystem.....	21
Figura 11: Enzima ExoSAP-IT.....	22
Figura 12: Resultados de la RT-PCR tiempo real del plato N°10.....	24
Gráfico 1: Total de muestras extraídas, amplificadas y secuenciadas durante el 2011-2019.....	25
Gráfico 2: Distribución de muestras positivas para PIVh-4 por mes y año de estudio.....	26
Gráfico 3: Condición Clínica de pacientes afectados por PIVh-4 durante 2011-2019.....	27
Gráfico 4: Frecuencia de PIVh-4 por región en los años 2011-2019.....	28
Gráfico 5: Distribución de las edades de pacientes infectado por PIVh-4.....	29

Gráfico 6: Frecuencia según sexo en pacientes positivos por PIVh-4.....	29
Grafica 7: Sintomatología por infección del virus PIVh-4 durante 2014-2019.....	30
Gráfico 8: Tipo de infecciones de las muestras positivas a PIVh4.....	31
Gráfico 9: Coinfecciones con muestras positivas a otros virus respiratorios.....	31
Figura 13: Árboles filogenéticos de PIVh-4A y PIVh4B.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de los primer utilizados para la PCR-tiempo real.....	17
Tabla 2: Componentes de la mezcla de reacción para la RT-PCR tiempo real.....	17
Tabla 3: Programa de temperatura del termociclador para realizar la RT-PCR tiempo real.....	18
Tabla 4: Secuencia de los primer utilizados para la prueba de RNasa P.....	18
Tabla 5: Componentes de la mezcla de reacción para la RT-PCR punto final.....	19
Tabla 6: Programa de temperatura del termociclador para realizar RT-PCR punto final.....	19
Tabla 7: Total de muestras de hisopado nasofaríngeo extraídos, amplificado y secuenciados durante el 2011 al 2019.....	25
Tabla 8: Sintomatología por infección del virus PIVh-4 durante 2014-2019.....	30
Tabla 9: Cantidad de secuencias del serotipo PIVh-4A y PIVh-4B, correspondientes a los años 2011-2019.....	33

RESUMEN

El virus de la Parainfluenza Humano tipo 4 (PIVh-4) fue identificado por primera vez en 1959, adicional, se describió la existencia de dos subtipos antigénicamente distintos; y fueron llamados PIVh-4A y PIVh-4B, desde entonces se asocia principalmente con infecciones agudas de las vías respiratorias bajas en niños menores de cinco años, personas inmunocompetentes y adultos mayores. Al ser un virus de baja frecuencia no se incluye dentro del panel de detección para virus respiratorio en Panamá, por lo que se carecen de datos referentes a su circulación en Panamá. El objetivo principal de esta investigación fue demostrar la circulación del virus Parainfluenza Humano tipo 4 durante los años 2011 al 2019 en la República de Panamá. En este estudio se analizaron un total de 1,162 muestras de hisopados nasofaríngeos enviados al Instituto Conmemorativo Gorgas de estudios de la Salud, como parte del Programa de Vigilancia Epidemiológica para influenza y otros virus respiratorios. A estas muestras se les extrajo el ARN para posteriormente amplificar el gen N de PIVh-4 a través de una RT-PCR tiempo real, y luego se secuenciaron los productos amplificados para luego caracterizarlas en los subtipos PIVh-4A o PIVh-4B. De las 1,162 muestras, 20 (1.7%) amplificaron y de estas se obtuvieron 9 (45%) secuencias. Ocho de las secuencias analizadas pertenecieron a subtipo PIVh-4A y solo una al serotipo PIVh-4B, mostrando una mayor prevalencia en nuestro país del subtipo PIVh-4A. Este es el primer registro en la República de Panamá en el cual se evidencia la circulación del PIVh-4, el cual muestra que ambos subtipos tanto PIVh-4A y PIVh-4B circularon durante los años de estudio 2011 al 2019.

Palabras claves: Amplificación, circulación, genotipo, PIVh-4A, PIVh-4B, prevalencia, Virus de Parainfluenza humano tipo 4.

INTRODUCCIÓN

El virus Parainfluenza Humano Tipo 4 (PIVh-4) pertenece a la familia *Paramyxoviridae* dentro del género *Rubulavirus* y fue identificado por primera vez en 1959 por Johnson (KM Johnson et al, 1960). Según las diferencias antigénicas demostradas por la inhibición de la hemoadsorción y la reactividad de los anticuerpos monoclonales se describió la existencia de dos subtipos del virus Parainfluenza 4 (PIVh-4) antigénicamente distintos y fueron denominados PIVh-4A y PIVh-4B (Cordero et al, 2007). La primera secuenciación completa del genoma de este virus correspondió a PIVh-4B el cual se basó en un aislado clínico denominado SKPIV4 (Yea et al, 2009), mientras que la secuencia del PIVh-4A se logró en el año 2011 (Komada et al, 2011).

Los genes de PIVh-4A y PIVh-4B para fosfoproteína (P) tienen 1 535 nucleótidos (nt), incluido el tracto poli(A) (Kondo et al, 1990). La proteína de la matriz (M) de los serotipos de PIVh 4A y 4B se determinaron a partir del ADNc del ARNm, se encontró que contiene 1 548 bases de longitud, excluyendo la secuencia de la cola poli-A y se observó un alto grado de identidad (96,1%) entre las secuencias de aminoácidos de PIVh-4A y PIVh-4B (Kondo et al, 1991). Las proteínas de la matriz de paramixovirus (M) parecen desempeñar funciones importantes en el ensamblaje del virión, el establecimiento de una infección persistente y la patogénesis viral (Komada et al, 1989).

Mientras que la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) presenta aproximadamente 2, 600 nucleótidos (Bando et al, 1990). Empleando MAb (Monoclonal antibodies), se evidenció que las propiedades antigénicas de las proteínas F de PIVh-4A y PIVh-4B son diferentes, incluso la secuencia del gen F difieren en tamaño, para el PIVh-4A consiste en 2,149 nucleótidos y para PIVh-4B de 2,135 nucleótidos, excluyendo la cola poli-A (Komada et al, 1995).

Este virus se asocia con enfermedad respiratorias leve en personas jóvenes (Zhou et, al 2021), sobre todo en niños menores de cinco años (Thomazelli et al, 2018; Xiao et al, 2016), y ancianos (DeGroot et al, 2020; Gu et al, 2020). Está relacionado

con infecciones agudas graves bajas, en pacientes hospitalizados con neumonía, bronquitis, bronquiolitis (Han et al, 2022) y en personas inmunocompetentes, así como en pacientes críticos (Miall et al, 2000; Essa et al, 2017).

Los PIVh tipo 4 se pueden encontrar en todo el mundo y se cree que es relativamente ubicuo. Generalmente se propagan por contacto directo con secreciones respiratorias o por propagación en el ambiente. Este virus es difícil de aislar en cultivo celular y la asociación que se tiene reportada con una enfermedad respiratoria leve, por lo que lo excluyen en los paneles de rutina de detección en aspirados nasofaríngeos (Lau et al, 2005).

Hasta ahora en nuestro país no se había descrito la detección del PIVh-4 y tampoco se ha caracterizado, basándose en el análisis molecular por la baja frecuencia de enfermedades respiratorias inferiores. En 5 de 10 países de Sur América y América Central estudiados anteriormente del 2006-2010, han logrado la amplificación, secuenciación y comparación de secuencias publicadas del gen P en GenBank.

Este virus al ser asociado con una enfermedad respiratoria más leve y una tasa de recuperación de cultivo celular más baja, son razones por las que se pasa por alto en las muestras de vigilancia respiratoria. No obstante, a pesar de la baja capacidad patógena que se le atribuye, el PIVh-4 tiene capacidad para desencadenar un brote y lograr afectar a infantes menores de cinco años y causar enfermedad respiratoria baja (Aguilar et al 2000; Villaran, M et al. 2013). Por eso, el objetivo de este estudio es demostrar la circulación de este virus y caracterizar las muestras positivas para contribuir así con el programa de vigilancia epidemiológica para Influenza y otros virus respiratorios en nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar la circulación del virus Parainfluenza humano tipo 4 en muestras provenientes de pacientes con infecciones respiratorias agudas durante los años 2011 al 2019 en Panamá.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia del Parainfluenza virus humano tipo 4 en muestras respiratorias.
- Evaluar la frecuencia de PIVh-4 según los datos epidemiológicos de cada paciente.
- Caracterizar molecularmente las muestras positivas y compararlas filogenéticamente con las secuencias de otros países.
- Demostrar el nivel de coinfección de PIVh-4 con diferentes virus respiratorios en muestras con resultados positivos.

HIPOTESIS

Ho: El virus Parainfluenza 4 no ha circulado en Panamá durante los años 2011-2019.

Ha: La frecuencia del Parainfluenza virus humano tipo 4 (PIVh-4) en Panamá fue baja durante los años 2011-2019 y fue más frecuente en niños menores de 5 años.

CAPÍTULO I: MARCO TEORICO

Descubrimiento del PIVh-4

Johnson et al, identificaron el PIVh-4 por primera vez en 1959, cuando aislaron en cultivo de tejido de riñón de mono asociado con una enfermedad respiratoria en niños con casos de bronquitis, traqueo-bronquitis, neumonía y en su mayoría requirieron de hospitalización. Algunas propiedades de este virus justificaron que los investigadores lo incluyeran dentro de los Mixovirus, ya que se habían descubierto que poseían propiedades similares a la de los virus de la Influenza, las paperas, la enfermedad de Newcastle y Virus de Parainfluenza 1, 2 y 3. A este agente se refirieron como el virus M-25.

En 1962 *Canchola et al*, durante un estudio recuperaron 25 cepas que poseían las propiedades biológicas del virus Parainfluenza tipo 4. Las cepas eran indistinguibles mediante cultivos de tejidos de hemadsorción, encontraron que los aislados pertenecían a uno de dos subgrupos. Dos de los aislados fueron similares a la cepa M-25 y fueron asignados al subtipo A, mientras que los 23 restantes eran antigénicamente distintos y fueron asignadas al subtipo B. Este fue la primera demostración de variación antigénica del Virus Parainfluenza tipo 4 (*Canchola et al*, 1962).

No fue hasta 2009 cuando en un estudio se obtuvo la primera secuenciación completa del genoma de PIVh-4 de aislado clínico llamado SKPIV4 obtenido del Hospital Pediátrico en Toronto. Las regiones que codificaron para las proteínas del virus presentaron una alta identidad del 95 a 97% correspondían para PIVh-4B. Una característica que se encontraron del genoma es su longitud con más de 17 kb lo que lo convertía en el genoma más largo dentro del género *Rubulavirus*. (*Yea et al*, 2009).

Clasificación taxonómica

Taxonómicamente, los virus de Parainfluenza Humano pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*, el cual también incluye Metapneumovirus Humano (MPVh) y Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSRh). Existen 4 tipos de Parainfluenza y dos

subtipos (4A y 4B). Los virus PIVh-1 y PIVh-3 se incluyen dentro del género *Respirovirus*, mientras los virus PIVh-2 y PIVh-4 pertenecen al género *Rubulavirus* (Gu et al, 2020; Álvarez et al, 2018; Zhou et al, 2021).

Estructura y Organización Genómica

Los viriones del PIVh-4 son pleomórficos, envueltos que tienen entre 150 a 300 nm de diámetro. Consta de un núcleo de nucleocápside se empaqueta en una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula huésped durante la gemación. La envoltura tiene proyecciones superficiales en forma de espiga compuestas por homotrímeros y tetrámeros de glicoproteínas específicas del virus (Branche & Falsey, 2016; Vainionpää & Hyypiä, 1994; Karron and Collins, 2007; Park et al, 2014) (**Figura 1**).

El genoma de PIVh-4 consta de un ARN monocatenario de sentido negativo, no segmentado con aproximadamente 17,000 nucleótidos (Schomacker et al, 2012; Vainionpää & Hyypiä, 1994; Komada et al, 2010; Henrickson, 2003.) Las secuencias de nucleótidos completas de PIVh-4A y PIVh-4B constan de 17,052 y 17,304 nucleótidos respectivamente. Sus genomas contienen seis ORF característico de los *Paramixovirus*. Sin embargo, sus genomas son aproximadamente 2000 nt más largos que los otros PIV (Komada et al, 2010; Henrickson, 2003; Lednicky et al, 2012). Estos están organizados para codificar al menos seis proteínas estructurales comunes (3'-N-P-C-M-F-HN-L-5'), que se transcriben secuencialmente en ARNm separados, cada letra significa N (Nucleocapsid protein); P (Phosphoprotein); M (Matrix protein); F (Protein F); HN (Hemagglutinin-neuraminidase), L (Large protein). Contiene una región líder extragenética corta de 3' que consta de 55 nt para PIVh-4A Y PIVh-4B. El ORF 1 es de 101- 1,756 nucleótidos tanto en PIVh-4A como en PIVh-4B codifican para NP. El ORF 2 es de 2,041-3,238 nt tanto en PIVh-4A como en 4b codifican P/V. ORF 3 es de 3,531-4,679 para PIVh-4A tanto para PIVh-4B codifican para M. El ORF 4 tiene 5,174-6,805 nt para PIVh-4A como PIVh-4B codifican para F. ORF 5 tiene 7,522-9,246 en PIVh-4A y 7,506-9,230 en PIVh-4B codifican para

HN. ORF 6 tiene 9,986-16,825 en PIVh-4A y 9,970-16,809 en PIVh-4B codifica para L (Komada et al, 2010) (**Figura 2**).

La proteína N recubre el ARN genómico formando una nucleocápside altamente estable. La fosfoproteína (P) y la proteína grande (L) están estrechamente asociadas con el ARN viral para formar un complejo de ARN polimerasa. La Hemaglutinina-neuraminidasa (HN) que media la unión a los residuos de ácido siálico en las membranas de la célula huésped. La proteína de fusión (F) media la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped. La proteína de la matriz (M) recubre la superficie interna de la envoltura (Schomacker et al, 2012; Hendrickson, 2003; Yea et al, 2009; Komada et al, 2010).

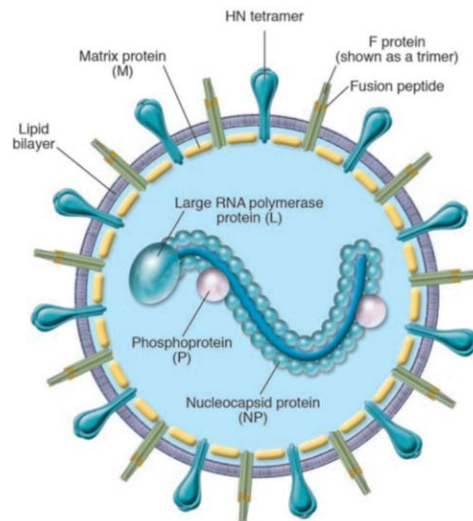


Figura 1: Diagrama Esquemático de la Estructura del Virus Parainfluenza Tipo 4. Fuente: (Branche & Falsey, 2016).

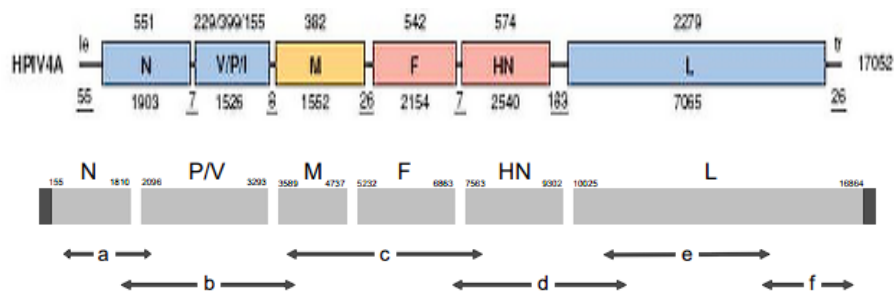


Figura 2: Ilustración Esquemática del genoma de PIVh-4A y PIVh-4B y las posiciones relativas de los amplicones. Fuente: (Karron and Collins, 2007; Yea et al, 2009).

Replicación

El primer evento en la replicación viral comienza con la unión de la partícula del virus con la célula receptora mediada por la HN glicoproteína, luego se lleva a cabo la fusión del virus con las membranas lipídicas de la célula huésped catalizada por la proteína F. A esto le sigue la expulsión de la nucleocápside del PIVh-4 al citoplasma de la célula. En el citoplasma, la transcripción se da mediante la ARN polimerasa (proteína L) dependiente de ARN específico del virus. A continuación, la maquinaria ribosómica celular traduce los ARNm virales en proteínas virales. Estos dirigen la replicación completa del genoma del virus, primero en una hebra de sentido positivo y luego en la hebra negativa adecuada. Una vez producidas, estas hebras únicas de ARN sentido negativo se encapsulan con la NP y pueden usarse en rondas posteriores de transcripción y replicación para su liberación como un nuevo virión (Hendrickson, 2003; Karron and Collins, 2013) (**Figura 3**).

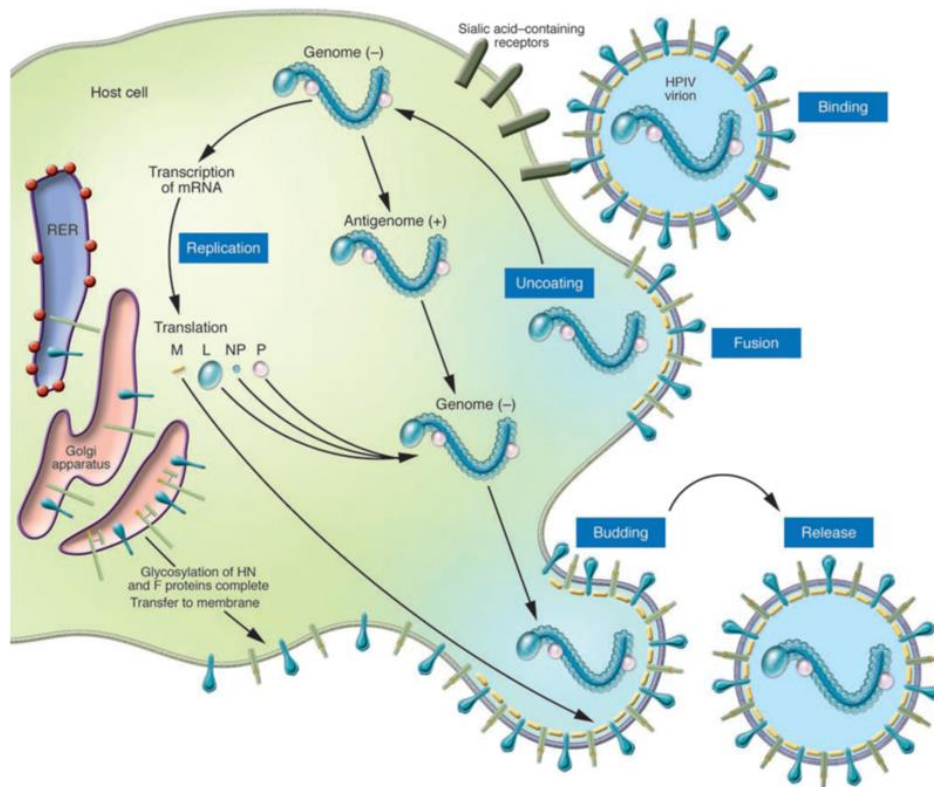


Figura 3: Ciclo de adhesión, fusión y replicación de los virus de parainfluenza. (Branche & Falsey, 2016).

Epidemiología

Las infecciones por el virus Parainfluenza tipo 4 ocurren en todo el mundo, se adquieren en la comunidad sin límites étnicos, socioeconómicos, de género, de edad o geográficos. A diferencia de los otros tipos de Parainfluenza, la epidemiología de las infecciones por el PIVh-4 que circulan a nivel regional y mundial no se han dilucidado completamente e históricamente ha sido subestimado. Sin embargo, con las pocas evidencias de estudios nos muestra que los casos y datos se distribuyen entre bebés menores de 1 hasta 5 años siendo los más susceptibles que presenten enfermedades del tracto respiratorio inferior (Chellapuri et al, 2022; Henrickson, 2002; Aguilar et al, 2000). Los estudios han demostrado una seroprevalencia entre el 60 y 90% de los casos son asociados con lactantes, niños y adultos jóvenes. Según publicaciones recientes se han detectado el PIVh-4 en proporciones del 1,2-10,2 % del total de infecciones por PIVh. En la mayoría de los casos, los brotes están más estrechamente relacionados con el PIVh-4A que con el PIVh-4B, se sugiere que ambos genotipos son importantes en la población (Lau et al, 2009; Linster et al, 2018; Sugimoto et al, 2022; García García et al, 2002).

En China en el 2005 se reportó el primer brote de infección del tracto respiratorio asociado al PIVh-4 en Hong Kong representando el 5.2% principalmente en niños de escuelas comunitarias y trabajadores de la salud presentaban infecciones leves. Sin embargo, hubo casos que requerían hospitalización en niños causando una enfermedad grave. El análisis molecular se mostró para PIVh-4A (Lau et al., 2005). En otro estudio, durante los años 2004-2005 en Hong Kong de pacientes ingresados en dos hospitales, se detectó el 1.2% de casos reportados para PIVh-4 principalmente en niños pequeños y adultos inmunocomprometidos. La secuenciación de los genes de fosfoproteínas mostró que el 56% de los pacientes tenían infecciones por PIVh-4A, mientras que el 44% tenían infecciones por el PIVh-4B. Las cepas obtenidas correspondieron a PIVh-4A Y PIVh-4B, descritos con número de acceso en el banco de datos del NCBI (National Center for Biotechnology information) FJ608669 y FJ608702 respectivamente (Lau et al, 2009). En 2007 al 2010 se realizó un estudio comparativo en niños con infecciones del tracto

respiratorio inferior en Beijing, China, que detectó el 10,2% de casos para PIVh-4, principalmente en edades de 7 a 1 año (Ren et al, 2011). Un reporte de casos de Parainfluenza en niños Hospitalizados durante los años 2010-2011 en Hunan, China el 3.6 %correspondía para PIVh-4 en menores de 5 años. Se mostró que el 71,2% de casos pertenecía al genotipo PIVh-4A y el 28,5% de casos el genotipo PIVh-4B. Las cepas obtenidas fueron PIVh-4A (E03304.1) y PIVh-4B (E03305.1) (Xiao et al, 2016). En un estudio clínico para los virus de Parainfluenza 1 a 4 durante 2012 a 2018 en Bejín, China reportaron el 8,3% de los casos para PIVh-4 en niños menores de 1 año. Las secuencias obtenidas correspondieron únicamente al genotipo PIVh-4A se obtuvieron dos cepas secuenciadas de PIVh-4A (BCH4237A/2014 y BCH4263A/2014) cercanas a cepas de Japón, Taiwán, India y Estados Unidos (Shao et al, 2021). Mientras para los años 2017-2018 en un estudio de análisis genético para PIVh-4 en niños en Henan, China se reportó el 2.2% de casos en menores de 7 años. La secuencia completa en la mayoría correspondía para PIVh-4A y unas para PIVh-4B. Las cepas obtenidas para PIVh-4A denominadas HenanSA20180251/247/303/268/292 para PIVh-4A y HenanSA2018269/274 para PIVh-4B (Zhou et al, 2021).

En Japón desde 1989 Kondo y sus investigadores han realizados análisis de secuencias y comparaciones de las distintas proteínas del virus PIVh-4. Sin embargo, desde aquel año no se han mostrado reportes de casos y brotes del virus. En un estudio durante los años 2011-2012 en Yamagata, Japón se reportó el 3% de casos incluía niños menores de 1 año hasta 15 años, en su mayoría se detectaron para PIVh-4B y otros para PIVh-4A. Obtuvieron las cepas correspondientes para PIVh-4A AB5433364a y para PIVh-4B AB0069584b (Abiko et al, 2013). Durante la epidemia de influenza en 2016 se reportó un caso de PIVh-4 para un menor de 1 año detectado para PIVh-4A que presentaba una enfermedad respiratoria grave aguda (Oda et al, 2018). Mientras que en los años 2018-2022 se recolectaron muestras de pacientes pediátricos hospitalizados en Fukushima, Japón determinaron secuencias genómicas casi completas de seis cepas de HPIVh-4A y

cuatro de HPIVh-4B. Las cepas obtenidas fueron: MN306056 para HPIVh-4A y KY986647 para HPIVh-4B (Sugimoto et al, 2022).

En Corea del 2013-2017 se reportó el 22,4% de casos de niños ingresados con infección en el tracto respiratorio en un rango de 1 mes a 12 años (Gu et al, 2020) Para los años 2015-2021 se identificó 18,3% de infección en pacientes pediátricos menores de 3 años (Han et al, 2022).

En los países de Europa como España durante 1997-1998 se obtuvo el aislamiento de muestras de pacientes pediátricos para Parainfluenza 1 a 4 se identificó el 5% de los casos. Otro reporte del 2002 se identificó el 13,4% de infecciones en pacientes pediátricos en Madrid en lactantes menores de 2 años. Entre el 2016 y 2017 se reportó el 14.2% de casos en su mayoría en niños, pero también se reportaron en adultos (Aguilar et al, 2000; García García et al, 2002; Álvarez-Argüelles et al, 2018). En Francia durante 1998 a 2002 se obtuvo el primer reporte de infección por PIVh-4 donde identificaron 20 muestras de hospitalizados que incluían en la mayoría niños menores de 5 años y adultos mayores de 70 años (Billaud et al, 2005). En Alemania durante el 2015-2019 se realizó un estudio para mostrar la seroprevalencia y epidemiología molecular de los Parainfluenza, obtuvieron muestras de sitios centinelas identificaron el 1.4% en menores de 4 años de casos para PIVh-4 para ambos genotipos PIVh-4A y PIVh-4B se obtuvieron las siguientes secuencias MW645220–MW645229 (Oh et al, 2021). En Reino Unido se llevó a cabo un estudio retrospectivo para PIVh-2 y PIVh-4 entre el 2013-2017 el 2,31 se presentó para PIVh-4 e menores de 10 años y adultos mayores de 65 años. La epidemiología molecular mostró a los subtipos PIVh-4A Y PIVh-4B. Para PIVh-4A se obtuvieron 10 secuencias entre las designaciones: NUH PF4/Nottingham/2016 (7) /2017 (1) /2015 (1) / 2014 (1). Para PIVh-4B se obtuvieron 12 secuencias entre las designaciones: NUH PF4/Nottingham/ 2014 (11) /2015 (1), /2016 (1) (Chellapuri et al, 2022).

En Australia en el 2008, se ha reportado en muestras clínicas de niños un 1.7% de casos por este virus. La mayoría procedían de niños menores de dos años. Se detectó en la mayoría para PIVh-4A, pero también PIVh-4B (Wang et al, 2012).

En Estados Unidos desde 1998-2000 se reportó que el 5,8% de infecciones eran causadas por PIVh-4 ambos genotipos fueron detectados tanto PIVh-4A como PIVh-4B presentado en adultos con infección respiratoria (Hasman et al, 2009). En un estudio prospectivo en Washington para infecciones por PIVh-4 en niños que asisten a guarderías durante 2006-2009 se detectó el 10% de infecciones en niños menores de 2 años con el potencial de causar brotes en niños que asisten a guarderías y escuelas (Fairchok et al, 2011). En otro reporte sobre la circulación de PIVh en Estados Unidos durante el 2011-2019, mostró que el 13% de infecciones correspondían para PIVh-4, la mayor detección fue en niños menores de 2 años (DeGroot et al, 2020).

En Canadá entre el 2001 y 2005 se reportó el 0.7% de casos principalmente en niños y adultos. Obtuvieron ocho cepas diferentes de PIVh-4A (HPIV-4A-d49821) y una para PIVh-4B (HPIV-4B-d49822) (Vachon et al, 2006). Para los años 2010-2013 en Alberta se reportó el 16% de casos en menores de un año, adultos mayores de 65 y una baja frecuencia en adultos jóvenes 18-64 años y adolescentes 12-17 años (Fathima et al, 2016).

El único reporte que hay para América Central y Suramérica durante 2006-2010 se reportó el 1% de casos detectados para PIV4, solo en cinco países de Suramérica en niños menores de 1 año en el 2010, no se identificaron casos en Centroamérica. El análisis filogenético de las muestras colectadas en Perú pertenecía al PIVh-4A y una muestra colectada en Argentina correspondía para PIVh-4B (Villaran et al, 2013). Otro reporte de casos para PIV4 en Brasil demostró que el 11,5% de las infecciones se presentaban en niños menores de 1 año durante los años 2008 a 2010 (Thomazelli et al, 2018).

Estacionalidad

Las infecciones por PIVh-4 que se han descrito estacional en distintos países alternando temporadas epidémicas anuales o bienales mayores y menores (Fathima et al, 2016; Chellapuri et al, 2022; De Groote et al, 2020). Los brotes ocurren generalmente durante finales de otoño e invierno en países templados. Pero países como China, Japón y Corea han reportado patrones estacionales con mayor frecuencia durante la primavera y verano (Ren et al, 2011; Zhou et al, 2021). Estudios nacionales durante varios años en el Reino Unido y Estados Unidos informan epidemias anuales durante el otoño/invierno (Han et al, 2022; Gu et al, 2020). Para países tropicales y subtropicales de América Latina estudiados se ha visto un patrón bienal que circulan durante la temporada de invierno. La dinámica temporal del PIVh-4 que se han reportado que circulan simultáneamente y alcanza niveles más alto de actividad durante años impares y se alternan con PIVh-2 y PIVh-3, quienes también co-circulan y alcanzan su máxima actividad en niveles durante años pares (Álvarez-Argüelles et al, 2018; Yano et al, 2014; Villaran et al, 2013; Oh et al, 2021). La aceptación continúa del PIVh-4 en la vigilancia rutinaria y en la agregación de datos a nivel nacional en los países del mundo aclarará aún más la incidencia y estacionalidad del PIVh-4.

Patogénesis

El PIV4 se ha considerado menos importante desde el punto de vista clínico y se ha asociado con una enfermedad del tracto respiratorio superior en niños y adultos. En los últimos tiempos, son más casos de importancia clínica que puede haberse subestimado la capacidad de patogénesis del virus.

Luego de la exposición al virus los síntomas de la infección común son fiebre y tos con o sin esputo, seguidos dolor de cabeza, garganta y vómitos. La infección generalmente comienza con fiebre alta de 39 a 40°C que dura de 2 a 5 días. Distintas series de casos reportados han sugerido la asociación del virus con una enfermedad más grave en niños menores de 5 años que presentan bronquiolitis y neumonía adquirida en la comunidad que requieren hospitalización con una

estancia de 2 a 14 días por enfermedad respiratoria grave (Aguilar et al, 2000; Lau et al, 2005; Hayati Beka et al, 2012; Thomazelli et al, 2018; Zhao et al, 2017). También es común que en los casos de infección para PIVh-4 se detecte con frecuencia la co-detección de Rinovirus, Virus Sincitial Respiratorio (VSR) y con otros PIVh como el tipo 1 y 2 en pacientes pediátricos (Han et al, 2022; Ren et al, 2011).

Diagnóstico

Las pruebas específicas del PIVh-4 a menudo no están disponibles en los laboratorios de diagnóstico (Zhao et al, 2017; Chellapuri et al, 2022). Debido a las dificultades para aislar el PIVh-4 ya que es más difícil de cultivar en cultivo de tejidos, con hemadsorcion tardía y efecto citopático, por lo que rara vez se aísla. Mediante ensayo de inmunofluorescencia y la utilización de anticuerpo monoclonal conjugado para la identificación en cultivos de tejidos y detección directa en muestras respiratorias. Pero no se utiliza de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios de virología clínica, suelen incluir el PIVh-1,2 y 3 en los paneles rutinarios de detección de virus respiratorio. Como resultado, las infecciones por PIVh-4 se reconocen mucho menos que los otros virus de PIVh.

Recientemente, se ha desarrollado el ensayo por RT-PCR para detección directa en pacientes pediátricos y se ha demostrado que es más sensible, específico y rápido que el aislamiento de cultivos celulares (Wang et al, 2012; Lau et al, 2005; Linster et al, 2018; DeGroot et al, 2020)

El análisis molecular, especialmente análisis de secuencias genéticas, se ha llevado a cabo en las investigaciones de brotes para Parainfluenza que se han publicado demuestra ser de gran valor para comprender la epidemiología y los ciclos de transmisión del virus según el subtipo. Según las pruebas de inhibición de hemaglutinación y anticuerpos neutralizantes se subdivide el PIVh-4 en 4A y 4B. Después, se demostró con la secuenciación completa una diferencia significativa entre los genes del PIVh-4A y PIVh-4B (Yea et al, 2009; Komada et al, 2010; Oh et al, 2021; Shao et al, 2021).

CAPITULO II: METODOLOGIA

Este estudio se realizó en los laboratorios del Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud (ICGES) de Panamá. Se utilizaron muestras de hisopados nasofaríngeos almacenadas en el Departamento de Investigación de Biotecnología y Virología, de los años 2011 al 2019, los cuales fueron enviados al ICGES a través de 18 sitios centinelas distribuidos a nivel del país para el programa de vigilancia epidemiológica de influenza y otros virus respiratorios. El uso de estas muestras fue sometido y aprobado por el Comité de Bioética de la Investigación del Instituto Conmemorativo Gorgas Estudios de la Salud (CBI-ICGES) denominado Protocolo “Investigación para el fortalecimiento en la vigilancia epidemiológica de Influenza y otros virus respiratorios en Panamá”, Versión 1, fecha 03 de agosto de 2022.

- **Extracción de ARN**

Para este estudio se extrajeron 1, 162 muestras de hisopados nasofaríngeos de 2011 (136 muestras), 2012 (147 muestras), 2013 (123 muestras), 2014 (164 muestras), 2015 (128 muestras), 2016 (170 muestras), 2018 (91 muestras) y 2019 (139 muestras) (**Figura 4**). La extracción de ARN se realizó utilizando el kit MagMAXTM Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation; procesadas por el equipo automatizado KingFisher Flex Thermo Scientific de 96 muestras.

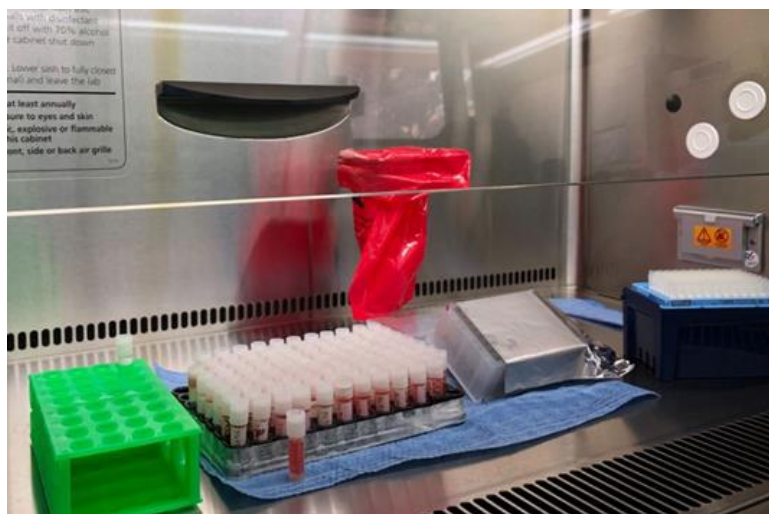


Figura 4: Extracción de las muestras de hisopados nasofaríngeos almacenado a 80°C de los años 2011 al 2019.

El volumen extraído fue de 200 µl de muestra y preparáramos con anticipación los reactivos que se necesitaron al momento de la extracción automatizada los cuales incluye los 500 µl Wash 1, 500 µl Whash 2 y 50 µl Elution.

De igual forma realizamos la extracción de ARN utilizando el Kit de extracción QIAamp Viral RNA Mini *Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany), el motivo de la utilización de este Kit es que eran muy pocas muestras las que necesitaban re-extracción, y este método resultaba más factible.

El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se agregó 5.6 µL de Carrier.
2. Luego se añadió 200 µL de muestra y para lisar, se agregó 560 µL de reactivo AVL. Después se mezcló con un vortex por 15 segundos y se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Además, se centrifugó brevemente para remover las gotas de la muestra que puedan quedar en la tapa.
3. Posteriormente, se agregó 560 µL de etanol absoluto y se mezcló con un vortex por 15 segundos.
4. Cuidadosamente, se añadió 630 µL del lisado a la columna (Mini spin Column) previamente rotulada y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 min.
5. Luego se retiraron los tubos de la centrífuga y la columna (Mini spin Column) se colocó en un nuevo tubo de colecta.
6. Se repitió los dos pasos anteriores, hasta que todo el lisado estuviese en la columna de centrifugación.
7. Luego se agregó 500 µL de solución de lavado AW1 y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto. Se Colocó la columna en un nuevo tubo de colecta y se agregó 500 µL de solución de lavado AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos.
8. Luego se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL limpio, rotulado y se agregó 70 µL de solución AVE, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto.

9. Por último, se descartó la columna y se almacenó el RNA a -20°C o -70°C para evitar su degradación.

- **RT-PCR en un solo paso**

Esta RT-PCR fue realizada para detectar el PIVh-4 mediante la amplificación de 133 pares de bases (pb) del gen de la proteína N, utilizando el Kit comercial de amplificación AgPath-ID™ One-step RT-PCR kit de Applied Biosystem con referencia 438739 perteneciente al Lote 1907238, el cual permite realizar el reverso transcripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un solo paso. La mezcla de reacción estuvo compuesta por Nuclease-Free Water, 2X RT-PCR Buffer, 25 RT-PCR Enzima, Sonda TaqMan, Primer Reverse y Primer Forward (**Tabla 1**) (**Figura 5**).

La PCR en tiempo real se realizó utilizando los primers y sonda proporcionados por el CDC, con un volumen final de 10 μl el cual contiene, 2 μl del ARN extraído y 8 μl del mix de reacción (**Tabla 2**). Utilizamos el termociclador QuantStudio 5 Real-Time PCR, para realizar la RT-PCR tiempo real empleado las temperaturas proporcionadas por el CDC (**Tabla 3**).

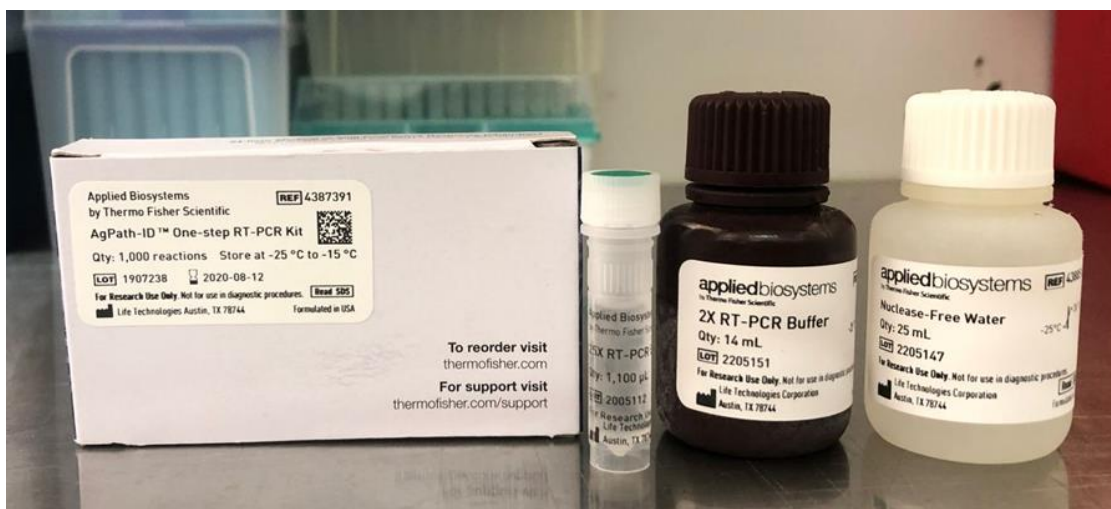


Figura 5: Kit comercial de amplificación AgPath-ID™ One-step RT-PCR kit de Applied Biosystem utilizado para la RT-PCR en un solo paso.

Tabla 1: Secuencia de los primer utilizados para la PCR-tiempo real

Reactivos	Secuencias de Nucleótidos
PIV 4 Forward	CTG CCA AAT GGG CAA TTAAAC
PIV 4 Reverse	CTG GCA GCAATC ATA AGR TGA TTC
PIV 4 Probe	CA TTA TTA TCT CTG C" T" TCC TTA CAG GCC ACA TCA

Tabla 2: Componentes de la mezcla de reacción para la RT-PCR tiempo real

Reactivos	Volumen
Nuclease-Free Water	1 µl
2X RT-PCR Buffer	5 µl
25 RT-PCR Enzima	0.5 µl
Sonda TaqMan	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl
Primer Forward.	0.5 µl
ARN de la muestra	2 µl
Volumen Final	10 µl

Tabla 3: Programa de temperatura del termociclador (QuantStudio 5 Real-Time PCR) para realizar la RT-PCR tiempo real

Programa del termociclador		
45°C	10 minutos	
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	45 ciclos
55°C	1 minuto	

- **Prueba de RNasa P**

Se realizó la detección de RNasa P en todas las muestras como control interno de extracción (**Tabla 4**).

Tabla 4: Secuencia de los primer utilizados para la prueba de RNasa P

Reactivo	Secuencia de nucleótidos
Primer Reverse	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'
Primer Forward	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'
Sonda	5'-/58UN/TTC TGA CCT GAA GGC TCT CCG CG/3IABkFQ/-3'

- **RT-PCR punto final**

De las muestras positivas al virus por la detección de RT-PCR en tiempo real se les realizó una RT-PCR punto final. Para esta amplificación se utilizó el kit comercial de QIAGEN OneStep RT-PCR y los primer proporcionados por el CDC empleado para la detección en tiempo real (**Tabla 1**).

El mix de reacción estuvo compuesto por QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5x, dNTP mix, primer forward, primer reverse, Rnasa-free water y QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix, obteniendo un volumen final de 20 µl el cual contiene, 5 µl del ARN extraído y 15 del mix de reacción (**Tabla 5**) (**Figura 6**).

Tabla 5: Componentes de la mezcla de reacción para la RT-PCR tiempo final

Reactivos	Volumen
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5x	5 µl
dNTP mix	1µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
Rnasa-free water	11 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix	1 µl
ARN de la muestra	5 µl
Volumen Final	20 µl

Tabla 6: Programa de temperatura del termociclador (Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal Cycler A24811) para realizar la RT-PCR punto final

Programa del termociclador		
50°C	30 minutos	
95°C	15 minutos	
94°C	1 minuto	35 ciclos
63°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	



Figura 6: Preparación del mix QIAGEN OneStep para la RT-PCR punto final.

- **Electroforesis**

Los productos obtenidos de la PCR punto final se visualizaron preparando un gel de agarosa al 1.5% (**Figura 7**), agregando 100 mL de buffer TBE al 0.5%, 1.5 g de agarosa y 3 μ L de bromuro de etidio. Una vez fue preparado el gel, se colocó el producto de amplificación previamente mezclado con el reactivo Loading Dye (**Figura 8**) (**Figura 9**), además se colocó el marcador de peso molecular (100 Pb) en cada extremo y se procedió a correr la electroforesis utilizando una fuente de poder a 100 voltios durante 45 minutos. Posteriormente el producto fue visualizado en un fotodocumentador de luz ultravioleta (**Figura 10**).

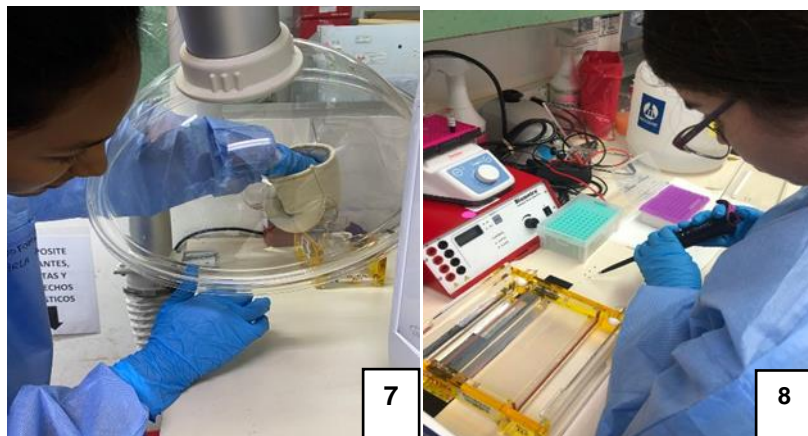


Figura 7 y 8: Preparación del gel al 1.5% de agarosa y colocación del producto de amplificación.



Figura 9: Loading Buffer y marcador de peso molecular (100 Pb) utilizados en la electroforesis.



Figura 10: Secuenciador 3130xl Genetic Analyzer de Applied Biosystem

- **Secuenciación**

Los productos de la RT-PCR punto final se purificaron utilizando la enzima EXOSAP-IT (**Figura 11**), en el cual se agregaron 2 μ l enzima y 5 μ l de producto y se colocaron en el termociclador a 37°C por 4 minutos, 80°C por 1 minuto.

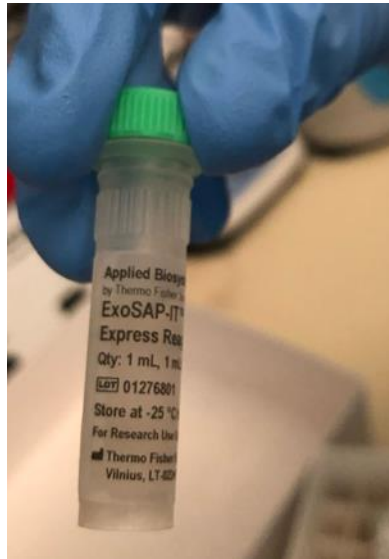


Figura 11: Ezima ExoSAP-IT utilizada para la purificación de los productos.

Para la reacción de secuenciación se preparó un mix con los siguientes reactivos: 1 μL de bigDye, 3,5 μL de Buffer 5x, 1 μL del cebador correspondiente ya sea Forward o Reverse los cuales fueron los mismo de la RT-PCR tiempo real, 1 μL muestra purificada y 3.5 μL agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de 10 μL de mezcla de reacción.

Se preparó un mix único agregando 3.5 μL de agua libre de nucleasas, 3.5 μL de Buffer 5x, 1 μL de bigDye, 1 μL de primer M13 y 1 μL de PGEM obteniendo un volumen final de 10 μL , este se colocó en un único pocillo del plato de secuenciación como control positivo de amplificación de la reacción de secuenciación.

Posteriormente colocamos el plato debidamente rotulado en un termociclador utilizando las siguientes condiciones de temperatura: 96 ° C durante 3 min, 96 ° C durante 10 s, 60 ° C durante 15 s, 60 ° C durante 4 min, seguido por 45 ciclos y por último un ciclo de extensión final de 4°C infinito

Seguidamente la reacción de secuenciación se purificó utilizando el kit de BigDye Xterminator utilizando 45 μL del SAM solution y 10 μL de Xterminator y se analizaron utilizando el equipo Analizador genético ABI 3130 xl. La secuenciación se realizó

utilizando el método de Sanger por capilaridad, el cual está basado en la capacidad del ADN polimerasa para generar cadenas de diferentes tamaños de ADN complementario a una cadena patrón, esto debido a que en la mezcla de reacción son incluidos los 4 dideoxynucleotidos marcados con fluorescencia diferencial, que al ser incorporados a la cadena en crecimiento detienen la polimerización.

- **Análisis filogenético**

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias representantes para cada subtipo reportado para el Virus Parainfluenza humano tipos 4, utilizando el software BioEdit v.7.7.1. El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA10, el mismo incluyo 75 secuencia.

CAPITULO III: RESULTADOS

Logramos analizar 1, 162 muestras de hisopados nasofaríngeo, 20 muestras resultaron positivas para el virus Parainfluenza humano tipo 4 mediante RT-PCR en tiempo real (**Figura 12**), lo que corresponde a una prevalencia de 1.71% (20/1,162) del total de las muestras estudiadas.

En el cuadro 1 se presenta la cantidad de muestras de hisopados nasofaríngeos extraídas, amplificadas y secuenciadas correspondientes a cada año de estudio. La mayor cantidad de muestras extraídas correspondieron al año 2017 (n= 170), seguido por las del 2014 (n=164). El mayor número de muestras amplificadas se registraron en el año 2014 (n=5) y 2017 (n=5), mientras que durante los años 2013 y 2015 no se registraron amplificaciones para el PIVh-4 (**Grafica 1**).

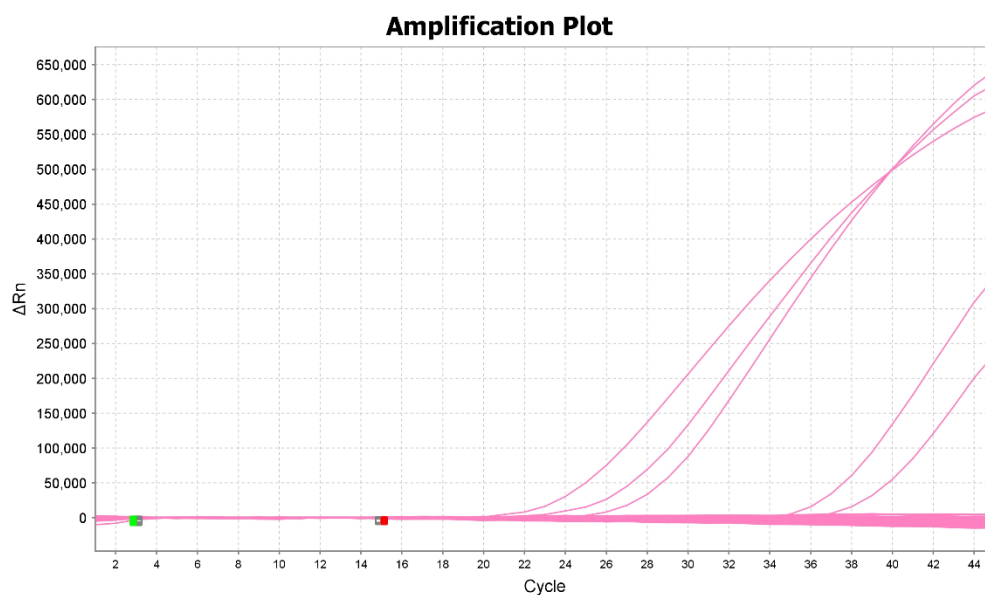


Figura 12. Resultados de la RT-PCR tiempo real del plato N°10

Tabla 7: Total de muestras de hisopado nasofaríngeos extraídas, amplificadas y secuenciadas durante el 2011 al 2019.

Año de Estudio	No. Muestras Extraídas	No. Muestras Amplificadas	No. Muestras Secuenciadas
2011	135	2	1
2012	147	2	2
2013	123	0	0
2014	164	5	1
2015	128	0	0
2016	65	2	1
2017	170	5	2
2018	91	3	1
2019	139	1	1
Total	1,162	20	9

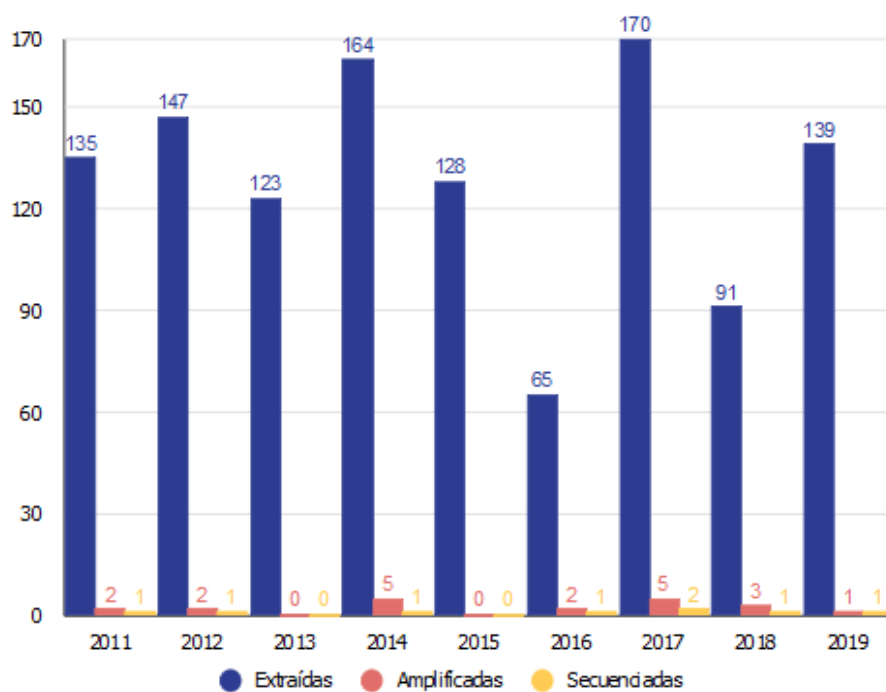


Gráfico 1: Total de muestras extraídas, amplificadas y secuenciadas durante el 2011-2019.

En cuanto a la distribución de casos positivos para el PIVh-4 según el mes y el año nos muestra (**Grafica 2**), el año 2011 2/135 (1.5%) muestras positivas en los meses de enero y marzo. En 2012 2/147 (1.3 %) muestras positivas ambas en septiembre. En 2014 5/164 (3.1%) muestras positivas, 1 en el mes de mayo, 2 en septiembre, 1 en noviembre y 1 en diciembre. En el 2016 2/165 (3%) muestras positivas en los meses de octubre y noviembre. En 2017 5/170 (3 %) de muestras positivas, 2 en marzo, 1 mayo, 1 junio y 1 julio. Las infecciones se presentaron tanto en meses de verano como de invierno. En el 2018 3/91 (3.2%) de muestras positivas en los meses de abril, mayo y junio. En 2019 1/139 (0.7%) muestras positivas en junio. Los años 2013 y 2015 nos presentaron muestras positivas para PIVh-4. No se presento una estacionalidad definida ya que existen casos tanto en meses de invierno como en los meses de verano.

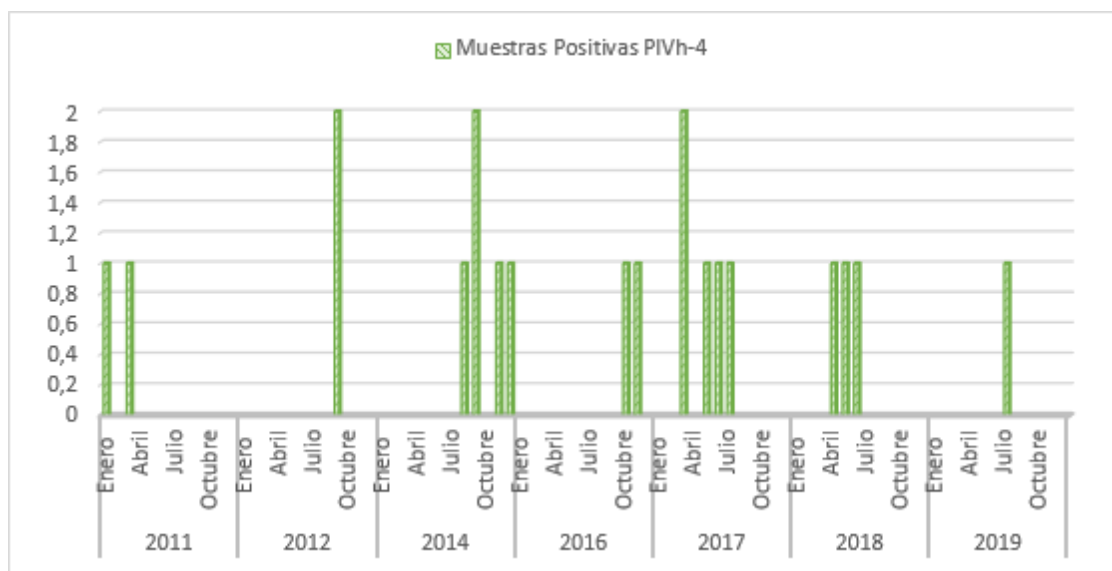
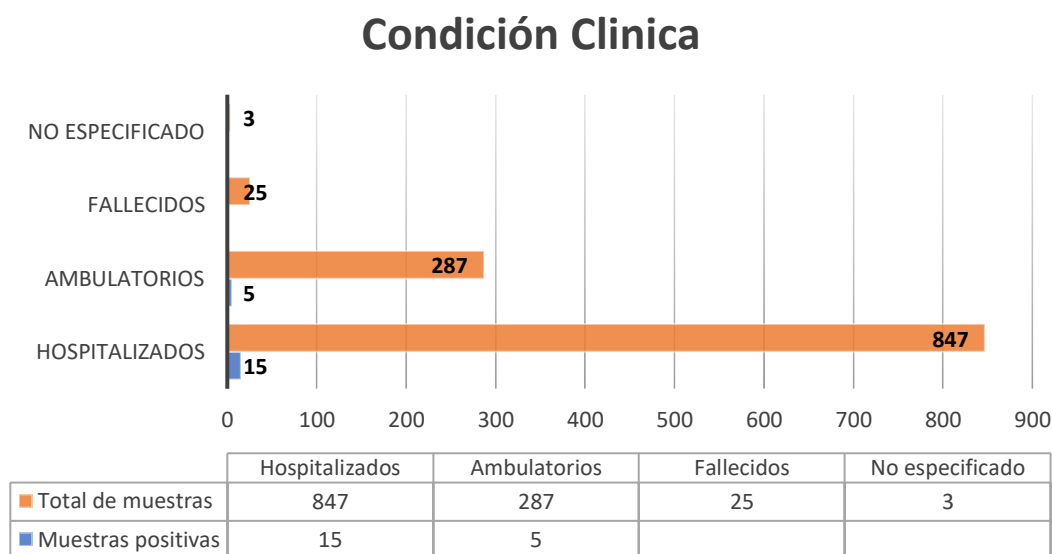


Gráfico 2: Distribución de muestras positivas para PIVh-4 por mes y año de estudio.

De las 20 muestras positivas 15 correspondían a pacientes hospitalizados, lo que representa el 75% (15/20) y 5 pacientes ambulatorios, 25% (5/20). Para este virus no se presentaron casos de pacientes fallecidos (**Grafica 3**). La mayoría de los

casos hospitalizados ocurrieron en la región de Los Santos y Colón n=3/20 (15%), seguido por San Miguelito y Veraguas con n=2/20 (10%) muestras positivas y Coclé, Chiriquí, Panamá Oeste, Herrera y Darién tan solo presentaron 1/20 (5%) caso de hospitalización por región. Los casos ambulatorios ocurrieron en la región de Panamá Metro n=4/20 (20%) y Panamá Oeste n=1/20 (5%),

Las regiones con mayor frecuencia del PIVh-4 fue Panamá metro con un 25%, seguido de Colón y Los Santos con un 15%, y en menor frecuencia a Panamá este, Panamá oeste, Chiriquí, Darién y Herrera con un 5% (**Grafico 4**).



Grafica 3: Condición Clínica de pacientes afectados por PIVh-4 durante 2011-2019.

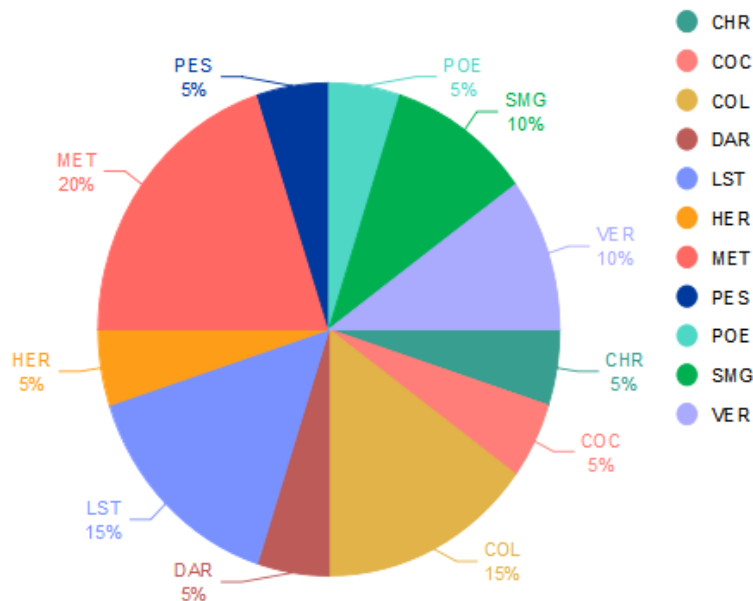
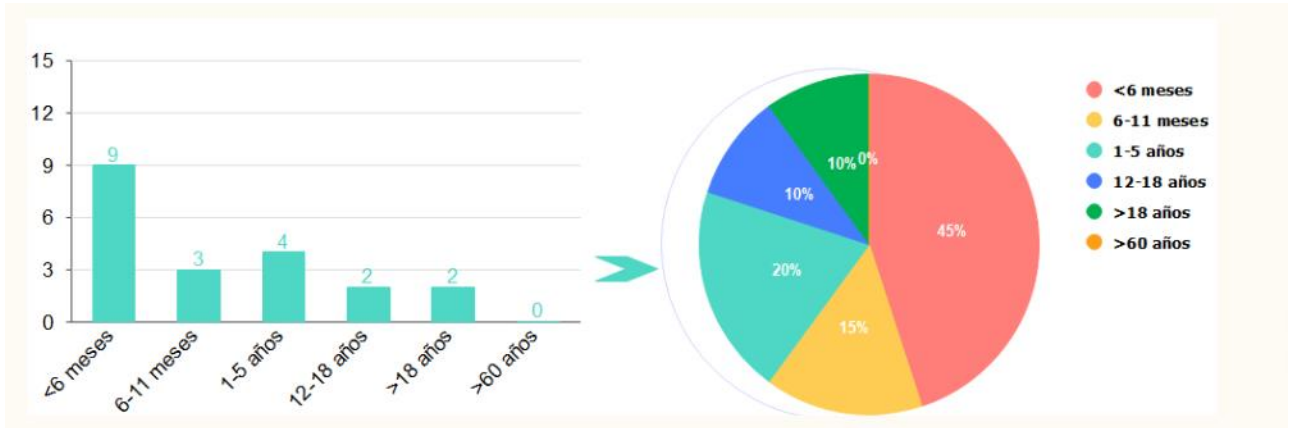


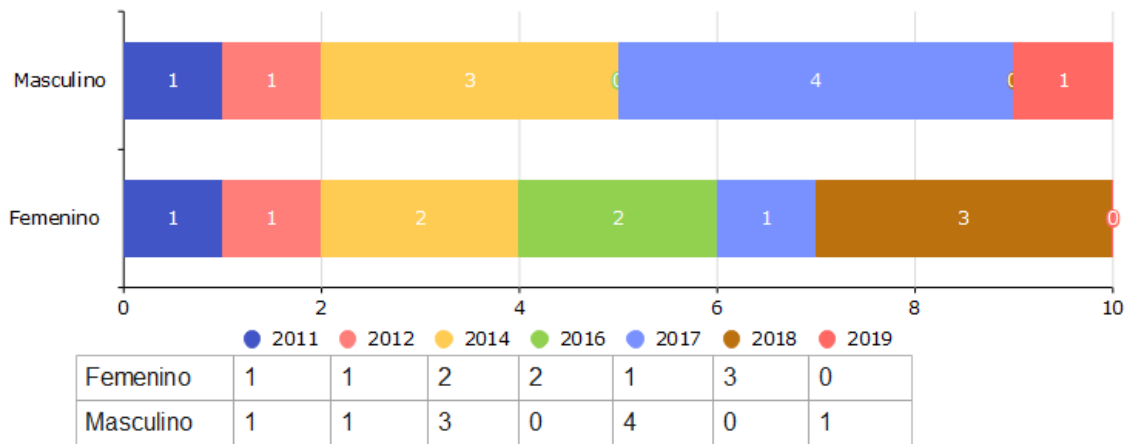
Gráfico 4: Frecuencia del PIVh-4 por región en los años 2011-2019.

Con respecto a la distribución de las edades de los casos de PIVh- 4 la mayoría se presentaron en niños menores de 5 años, el rango de edad más afectado se presentó en los bebés < 6 meses con un 45% (9/20), seguido de 1-5 años 20% (4/20), después el rango de edad de 6-11 meses presentó el 15% (3/20), 12-18 años 10% (2/20) y > 18 años 10% (2/20). En los rangos de edad mayor a 60 años no se presentaron muestras positivas para el virus de la Parainfluenza humano tipo 4. El 75% (15/20) de lo hospitalizados se encontraban en los rangos de edad menores de los cinco años representados de la siguiente manera 9 casos < 6 meses, 3 casos 6-11 meses, 2 casos de 1-2 años y 1 caso de 3-5 años (**Gráfico 5**). La edad promedio de infección para el virus fue de 1,5 años.

Según el sexo, hubo una frecuencia de 50% en el sexo femenino y 50% en el sexo masculino. En el 2011 y 2012 hubo una frecuencia del 5% (1) para ambos sexos. En el 2014 el 15% (3) para el sexo masculino, mientras el 10% (2) para el sexo femenino. En el 2016 el 10% (2) solo para el sexo femenino. En el 2017 el 20% (4) presentó para el sexo masculino, el 5% (1) para el femenino. En el 2018 el 15% (3) se presentó solo en el sexo femenino. En el 2019 el 5% hubo solo para el sexo masculino (**Gráfico 6**).



Grafica 5: Distribución de las edades de pacientes infectados por PIVh-4.

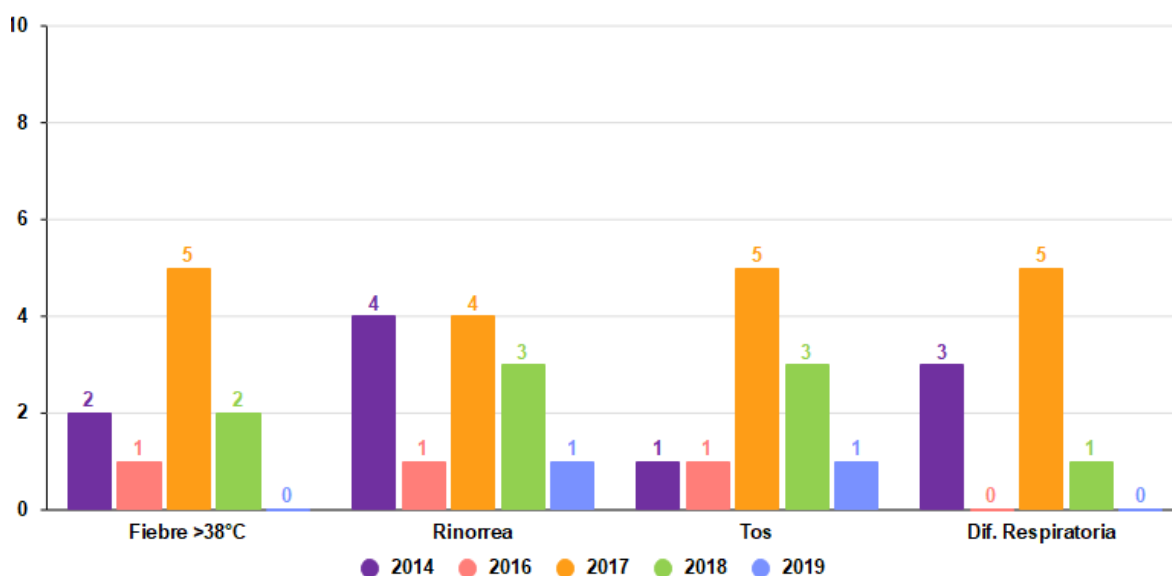


Grafica 6: Frecuencia según el sexo en pacientes positivos por PIVh-4.

Según la sintomatología, el síntoma más predominante en las infecciones por PIVh-4 fue rinorrea con un 81% (13/16), seguido por la tos 75% (12/16), fiebre > 38°C 63% (10/16) y dificultad para respirar 63% (10/16). En solo un 6% (1/16) se presentaron síntomas como cianosis, plaquetopenia e hipoxia. Estos resultados se basaron en 16 positivos, ya que los 4 restantes no tenían una información clara sobre los síntomas (**Tabla 8**) (**Grafica 7**).

Tabla 8: Sintomatología por infección del PIVh-4.

Sintomatología	2014 n=5	2016 n=2	2017 n=5	2018 n=3	2019 n=1
Fiebre >38°C	2	1	5	2	0
Rinorrea	4	1	4	3	1
Tos	1	1	5	3	1
Dificultad para respirar	3	0	5	1	0



Gráfica 7: Sintomatología por infección del virus PIVh-4 durante 2014-2019.

Las infecciones por el virus Parainfluenza humano tipo 4 se presentó en un 75% (15/20) de las muestras como monoinfección y el 25% (5/20) resultado positiva a coinfecciones con otros virus respiratorios (**Gráfica 8**). Estas coinfecciones se presentaron en un 40% (2/5) con el virus Parainfluenza humano tipo 3 en el año 2014 y 2017, seguido con un 20% (1/5) con Rinovirus en el año 2014 al igual que con Adenovirus (1/20) en el año 2011 y se presentó una muestra positiva a tres

virus, el virus Parainfluenza humano tipo 4, Bocavirus y el Virus Parainfluenza humano tipo 1 en el año 2011 (**Grafica 9**).

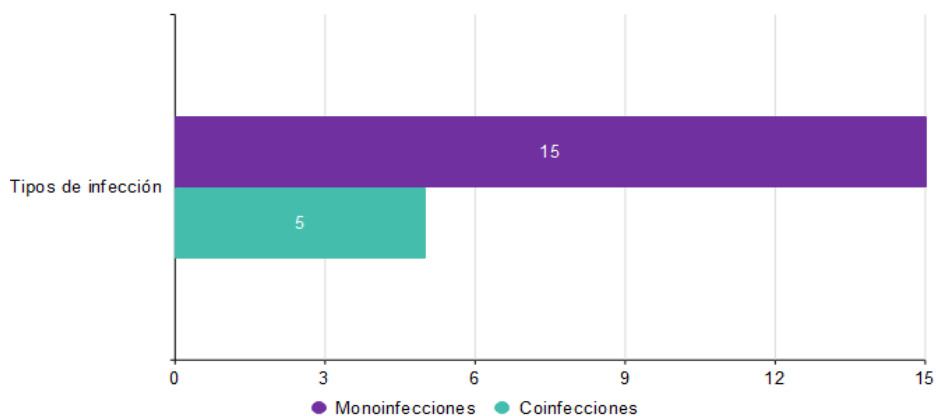
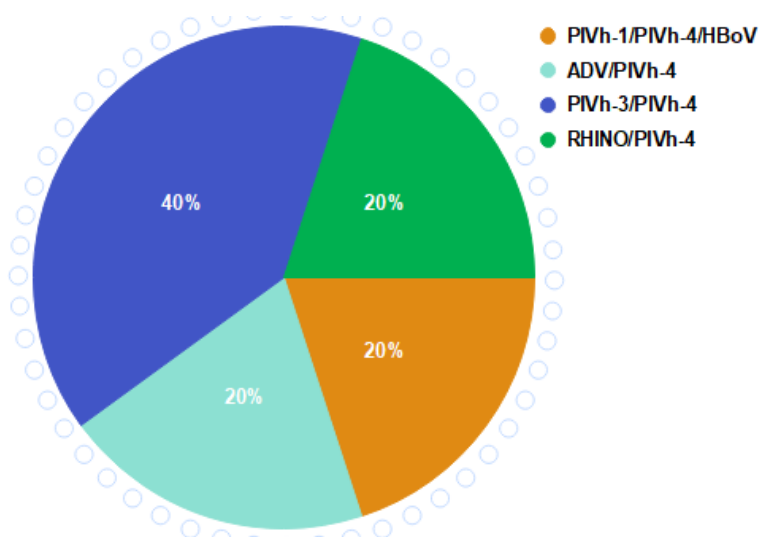


Gráfico 8. Tipo de Infecciones de las muestras positivas a PIVh-4



Grafica 9. Coinfecciones con muestras positivas a otros virus respiratorios.

En el análisis filogenético escogimos 9 muestras aleatorias. De estas 9 secuencias analizadas, 7 correspondieron al serotipo PIVh-A, mientras que 1 correspondió al serotipo PIVh-4B. En la tabla 9 se muestra la cantidad de secuencias del grupo PIVh-4A y PIV-4B obtenidas con respecto a los años de estudio. De las cepas del grupo PIVh-4A, una correspondió al año 2011, dos al año 2012, dos al año 2017 y

una tanto para el año 2018 como para el 2019, mientras que para el serotipo PIVh-4B la única secuencia pertenecía al año 2014. Siendo el serotipo PIVh-4A dominante en los nueve años de estudio.

Tabla 9: Cantidad de secuencias del serotipo PIVh-4A y PIVh-4B, correspondientes a los años 2011-2019

Numero de secuencias del serotipo PIVh-4A y PIVh-4B, correspondientes a los años 2011-2019									
Años de estudios									
Serotipo	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
PIVh-4A	1	2	-	0	-	1	2	1	1
PIVh-4B	0	0	-	1	-	0	0	0	0

El árbol filogenético del PIVh-4 fue basado en el gen N, utilizando el método de máxima verosimilitud (Nei & Kumar, 2000) mediante el programa MEGA 10 en donde se identificaron cada una de las cepas. Este análisis incluyó 17 cepas, 9 corresponden a aislados panameños 2011-2019 a excepción de los años 2013 y 2015 y 8 cepas de referencias. El primer clado agrupa un valor de homología nucleotídica de 98% para el serotipo PIVh-4A entre 8 cepas panameñas y la secuencia del GenBank EF088279/(NP)/4a. El clado que agrupa 1 cepa panameña para PIVh-4B obtuvo un valor de 95% de homología o Bootstrap, con las cepas de referencias MN306058/HPIV4bUSA/2019, LC706556/HPIV4b Fukushima, MT118680/4b, ON729323/4b. Los demás clados corresponden a cepas de referencias las cuales no se encontró mayor similitud. Las secuencias de nucleótidos de cepas panameñas fueron nombradas como: PIV4/ PAN (número de cepa) /año de recolección (**Figura 13**).

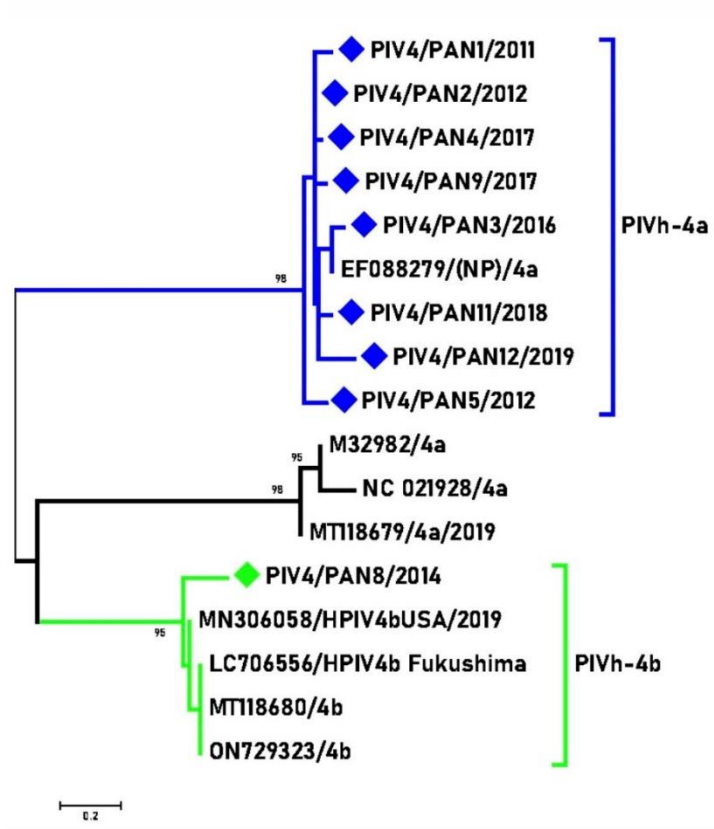


Figura 13: Árbol filogenético de PIVh-4A y PIVh-4B utilizando el gen N, las secuencias panameñas están identificadas por triángulos de color azul para el serotipo PIVh-4A y de color verde caña para PIVh-4B.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN

A pesar de que han pasado más de 60 años de la identificación del Parainfluenza virus humano tipo 4, su comprensión sigue siendo limitada debido a la dificultad de aislar este virus y solo unas pocas secuencias genómicas de PIVh-4 están registradas en Gen Bank.

El Virus Parainfluenza humano tipo 4 es causante de infecciones en el tracto respiratorio alto y bajo en niños, pacientes inmuno-comprometidos y adultos mayores, lo que representa un problema en la salud pública. Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente la importancia clínica del virus de Parainfluenza tipo 4 se encuentra menos definida que la de los otros virus de la Parainfluenza humana (Lau et al, 2005) y esto se debe a su difícil crecimiento en cultivos celulares, ya que este virus produce escaso efecto citopático y una hemoadsorción de aparición tardía lo que dificulta su identificación (Collins et al,1996), además los anticuerpos monoclonales específicos, para el aislamiento en cultivo celular (Rubien et al,1993) se han evaluado para la detección del crecimiento viral en cultivos, pero no para el diagnóstico directo en muestras clínicas (Garcia et al, 2002), todo lo antes mencionado y su baja frecuencia conlleva una baja vigilancia rutinaria de este virus, respecto a otros virus respiratorios

Nuestro estudio es el primero en abordar la detección de las infecciones respiratorias por PIVh-4 mediante la aplicación del método de RT-PCR, esto debido a que el PIVh-4 se suele asociar a infecciones respiratorias leves por lo tanto no está incluido en el panel de vigilancia de los virus respiratorios en Panamá. Sin embargo, estudios han demostrado una seroprevalencia del 50% en niño de 6 años y del 70% a 90% en adultos jóvenes con presencia de anticuerpos a PIVh-4 (Gardner et al, 1969).

En este estudio se analizaron 1,162 muestras de hisopado nasofaríngeo de 2011 a 2019, de las cuales 20 (1.7 %) muestras fueron positivas a PIVh-4. Este resultado se asemeja al estudio realizado en Corea con 12, 423 muestras de los años 2013-2017, de las cuales 231 (1.8%) muestras resultaron positivas a PIVh-4 utilizando

mRT-PCR (Gu et al, 2020) y a los realizados en la ciudad de Luohe, provincia de Henan, China, durante 2017-2018 en el cual se analizaron un total de 627 muestras de pacientes hospitalizados con infección respiratoria aguda grave, mediante RT-PCR para detección el virus de la Parainfluenza humana tipo 4 (PIVh-4) de las cuales, 14 muestras (2,2%) fueron positivas a PIVh-4 (Zhou et al, 2021).

Estados Unidos por su parte realizó un estudio mediante NREVSS (The National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System) durante los años 2011 al 2019, mismos años en que se realizó nuestro estudio. Se tomaron 2.700.135 muestras, de las cuales 15.283 (0.53%) resultaron positivas a PIVh-4 (DeGroot et al, 2020) y en Colorado, Estados Unidos se realizó un estudio en los años del 2009 al 2012, analizando 22,913 de las cuales 263 (1.1%) fueron positivas a PIVh-4 (Holly et al, 2013).

Mientras que en Huna provincia de China sea tomaron 771 muestras durante 2010-2011 de las cuales 28 (3.6 %) resultaron positivas (Xiao et al, 2016), en Brasil se recolectaron 1,002 muestras en los años 2008 al 2010 y se detectaron 30 (28.8 %) muestras positivas a PIVh-4 (Luciano et al, 2017).

En los años 2013 y 2015 nuestro estudio no presento ningún caso positivo a PIVh-4, mientras que durante los años 2014 y 2017 se detectaron gran parte de los casos positivos, algo similar sucedió en Corea ya que durante los años 2013 y 2016 no se detectó significativamente este virus, por otro lado, en los años 2014 y 2015, la tasa de detección de PIVh-4 fue significativamente mayor (Gu et al, 2020). Lo que concuerda con nuestro estudio en que el 2013 hubo una baja en la circulación del virus y a su vez en el 2014 ocurrió un aumento.

Las edades más afectado en nuestro estudio fueron niños menores de 3 años (80%), teniendo en cuenta que se analizaron muestras desde bebés con días de nacidos hasta personas menores de 95 años, con una predominancia de muestras de niños menores 6 meses. Esto coincide con informes anteriores. Estados Unidos menciona que el 37% de los infectados corresponde a niños < de 2 años (DeGroot et al, 2020). En el estudio realizado en la provincia de Henan, China todos los

pacientes tenían menos de 7 años y el 57% de ellos tenían menos de 3 años (Zhou et al, 2021), por su parte Corea menciona que el este virus infecta con mayor frecuencia a niños mayores a 3 meses (Gu et al, 2020). Mientras que la edad media de los pacientes en Colorado entre 2009 y 2012 fue de 4,1 años (Holly et al, 2013). Sin embargo, Dakota del Sur se presentó un pico de infecciones en personas mayores de 60 años (Hause et al, 2021). De modo que, el virus Parainfluenza humano tipo 4 progresivamente puede estar convirtiéndose en una causa importantes de IRAG en niños, con mayor gravedad de lo que se considera.

Las mono infecciones mostraron una mayor prevalencia respecto a las coinfecciones, esto es similar a según un estudio realizado en China en el cual el PIVh-4 presento la tasa de coinfección más baja en los pacientes infectados con otros virus de Parainfluenza (Ren et al, 2011). Se presentaron 5 casos de coinfecciones, el virus coinfectante más común fue PIVh-3 (40%), seguido por Rinovirus con (20%), Adenovirus (20%), HboV (20%) y PIVh-1 (20%), esto difiere un poco con otros estudios, ya que suelen mencionar que el PIVh-4 presenta una mayor tasa de coinfecciones es Rinovirus, sin embargo, coinciden en las demás coinfecciones (Holly et al, 2013; Gu et al, 2020; DeGroot et al, 2020)

También se mencionan coinfecciones con Enterovirus en Corea (Gu et al, 2020), Metapneumovirus humano, Coronavirus, Influenza y otro tipo adicional de HPIV en menores porcentajes (Holly et al, 2013), este último contradice nuestros resultados ya que fue el más común en nuestro estudio. Mientras que FluA, Flu B y RSV también se han encontrado como virus coinfectantes (DeGroot et al, 2020)

La estacionalidad de este virus aún no está del todo definida, esto debido a los pocos estudios que se le realizan por el alto costo que conlleva y la baja frecuencia que presenta. No obstante, en los pocos estudios realizados se ha evidenciado que el PIVh-4 suele aparecer a finales de otoño e invierno en países templados y con mayor frecuencia durante la primavera y el verano en países tropicales (Hasman, 2009; Gu et al, 2020; Oh et al, 2021). Mientras que otros mencionan que aparecen en periodo de dos años a finales de otoño y de invierno (Lau et al, 2009) (Aguilar et

al, 2000) (DeGroot et al, 2020). Nuestro país cuenta con un clima tropical, mientras que en la mayoría de los estudios son realizado en países con clima templado (Ren et al, 2011; Parsons et al, 2023; Gu et al, 2020).

En nuestro estudio el número de infecciones fue bajo, lo que no permitió discernir un patrón estacional definido de circulación del PIVh-4 (Abedi et al, 2016; Liu et al, 2013), sin embargo, se puede observar una tendencia en la cual las infecciones ocurren entre los meses de mayo y noviembre, época correspondiente a la temporada de invierno, puede estar relacionado al incremento de las lluvias facilita la exposición a los virus que producen síntomas respiratorios (Steen et al, 2014)

El 50% (10/20) de las muestras positivas a PIVh-4 correspondían a pacientes del sexo masculino, al igual que en el sexo femenino (10/20). Existen pocos estudios en los que se tomen en cuenta los datos sobre género ya que la mayoría al presentar una prevalencia baja lo omiten (Parsons et al, 2023; Gu et al, 2020; Holly et al, 2013), sin embargo, en Alberta, Canadá la infección se presentó ligeramente más en mujeres que en hombres (Sumana et al, 2016).

Los síntomas más predominantes en nuestro estudio fueron rinorrea, tos, fiebre y dificultad para respirar, esto concuerda con el estudio realizado en Corea el cual menciona que el síntoma más común de los pacientes infectados por PIVh-4 fueron tos, esputo, rinorrea (Gu et al, 2020). Mientras en Reino Unido predomina la fiebre, la dificultad para respirar y la tos, menciona también que la hipoxia, síntoma que se presentó en un 6% (1/16) de nuestras infecciones esta más relacionada con PIVh-4 que PIVh-1 y PIVh-2 (Chellapuri et al, 2022).

En el análisis filogenético de nuestras secuencias obtenidas se demostró que en nuestro país circula ambos serotipos, sin embargo, una mayor predominancia se encuentra estrechamente más relacionado con PIVh-4A, que con PIVh-4B. Nuestros resultados concuerdan con reportes realizados en otros países. En un hospital de Hong Kong en el año 2004 surgió un brote de PIVh-4 y mediante análisis moleculares determinaron que la cepa estaba estrechamente más relacionada con PIVh-4A (Lau, S. et al 2005). Los resultados obtenidos demuestran la similitud de

más del 95% con cepas principalmente de Estados Unidos y Japón con reportes de brotes en hospitales como la EFO88279/(NP)/4a en Estados Unidos (Lednicky et al, 2012) y LC706556/HPIV4b Fukushima reportada en pacientes pediátricos hospitalizados en Japón durante 2018 (Sugimoto et al, 2022).

CONCLUSIONES

Se logró detectar por primera vez la circulación del Virus Parainfluenza humano tipo 4 en Panamá, durante los años 2011 al 2019, arrojando una prevalencia de 1.7%, este porcentaje podría ser considerado como causante de infección respiratorias de las muestras que quedan sin diagnóstico en el panel de virus respiratorios de nuestro país.

Se mostró la coinfección con otros virus principalmente el PIVh-3, Rhinovirus, Adenovirus, Bocavirus y PIVh-1.

Se evidenció la presencia de los dos serotipos PIVh-4A y PIVh-4B, mostrando un mayor predominio en el serotipo 4A.

El uso de técnicas moleculares ha resultado ser eficientes para la detección de este virus y nos ha permitido estandarizar un protocolo para su detección, nuestros resultados brindan un aporte para seguir en la investigación de otras características del virus y así ampliar el conocimiento en Panamá.

RECOMENDACIONES

- En cuanto al manejo de las muestras se debe evitar la constante descongelación ya que aporta en la degradación del material genético.
- Analizar el genoma completo en un estudio prospectivo en muestras recientes para obtener mayor información, ya que no logramos la secuenciación completa.
- Realizar un estudio de seroprevalencia en muestras de todo el país y así poder realizar un análisis comparativo respecto a este.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A Abedi, G. R., Prill, M. M., Langley, G. E., Wikswo, M. E., Weinberg, G. A., Curns, A. T., & Schneider, E. (2014). Estimates of Parainfluenza Virus-Associated Hospitalizations and Cost Among Children Aged Less Than 5 Years in the United States, 1998–2010. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 5(1), 7–13. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu047>

Abiko, C., Mizuta, K., Aoki, Y., Ikeda, T., Itagaki, T., Noda, M., Kimura, H., & Tadayuki Ahiko. (2013). An Outbreak of Parainfluenza Virus Type 4 Infections among Children with Acute Respiratory Infections during the 2011–2012 Winter Season in Yamagata, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66(1), 76–78. <https://doi.org/10.7883/yoken.66.76>

Aguilar, J. C., Pérez-Breña M. P., García M. L., Cruz, N., Erdman, D. D., & Echevarría J. E. (2000). Detection and Identification of Human Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4 in Clinical Samples of Pediatric Patients by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1191–1195. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1191-1195.2000>

Álvarez-Argüelles, M. E., Rojo-Alba, S., Pérez Martínez, Z., Leal Negredo, Á., Boga Riveiro, J. A., Alonso Álvarez, M. A., Rodríguez Suárez, J., de Oña Navarro, M., & Melón García, S. (2018). New clinical and seasonal evidence of infections by Human Parainfluenzavirus. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(11), 2211–2217. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3363-y>

Billaud, G., Morfin, F., Vabret, A., Boucher, A., Gillet, Y., Crassard, N., Galambrun, C., Ferraris, O., Legrand, L., Aymard, M., Lina, B., Freymuth, F., & Thouvenot, D. (2005). Human parainfluenza virus type 4 infections: A report of 20 cases from 1998 to 2002. *Journal of Clinical Virology*, 34(1), 48–51. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2005.02.001>

Branche, A., & Falsey, A. (2016). Parainfluenza Virus Infection. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(04), 538–554. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>

Canchola, J., Vargosko, A. J., Kim, H. W., Parrott, R. H., Christmas, E., Jeffries, B., & Chanock, R. M. (1964). Antigenic Variation Among Newly Isolated Strains Of Parainfluenza Type 4 Virus¹. *American Journal Of Epidemiology*, 79(3), 357–364. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120390>

Chellapuri, A., Smitheman, M., Chappell, J. G., Clark, G., Howson-Wells, H. C., Berry, L., Ball, J. K., Irving, W. L., Tarr, A. W., & McClure, C. P. (2022). Human parainfluenza 2 & 4: Clinical and genetic epidemiology in the UK, 2013–2017, reveals distinct disease features and co-circulating genomic subtypes. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 13. <https://doi.org/10.1111/irv.13012>

DeGroot, N. P., Haynes, A. K., Taylor, C., Killerby, M. E., Dahl, R. M., Mustaquim, D., Gerber, S. I., & Watson, J. T. (2020). Human parainfluenza virus circulation, United States, 2011–2019. *Journal of Clinical Virology*, 124, 104261. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104261>

Fairchok, M. P., Martin, E. T., Kuypers, J., & Englund, J. A. (2011). A Prospective Study of Parainfluenza Virus Type 4 Infections in Children Attending Daycare. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 30(8), 714–716. <https://doi.org/10.1097/inf.0b013e3182113989>

Fathima, S., Simmonds, K., Invik, J., Scott, A. N., & Drews, S. (2016). Use of laboratory and administrative data to understand the potential impact of human parainfluenza virus 4 on cases of bronchiolitis, croup, and pneumonia in Alberta, Canada. *BMC Infectious Diseases*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1748-z>

Frost, H. M., Robinson, C. C., & Dominguez, S. R. (2013). Epidemiology and Clinical Presentation of Parainfluenza Type 4 in Children: A 3-Year Comparative Study to

Parainfluenza Types 1–3. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(5), 695–702.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jit552>

Fulginiti, V. A. (1967). Parainfluenza Virus Immunization. *American Journal of Diseases of Children*, 114(1), 26.
<https://doi.org/10.1001/archpedi.1967.02090220032005>

García García, M. L., Aguilar Ruiz, J., Echeverría Mayo, J. E., Calvo Rey, C., Pinto Fuentes, I., Ordobás Gabin, M., Roman Riechmann, E., & Pérez Breña, P. (2002). Infecciones por el virus parainfluenza tipo 4. *Anales de Pediatría*, 57(2), 116–120.
[https://doi.org/10.1016/s1695-4033\(02\)78684-0](https://doi.org/10.1016/s1695-4033(02)78684-0)

Gardner, S. A. (1969). The isolation of parainfluenza 4 subtypes A and B in England and serological studies of their prevalence. 67(3), 545–550.
<https://doi.org/10.1017/s002217240004198x>

Gu, Y. E., Park, J. Y., Lee, M. K., & Lim, I. S. (2020). Characteristics of human parainfluenza virus type 4 infection in hospitalized children in Korea. *Pediatrics International*, 62(1), 52–58. <https://doi.org/10.1111/ped.14049>

Guillaume Stewart-Jones, Chuang, G.-Y., Xu, K., Zhou, T., Acharya, P., Yaroslav Tsybovsky, Ou, L., Zhang, B., Fernandez-Rodriguez, B., Gilardi, V., Chiara Silacci-Fregni, Beltramello, M., Baxa, U., Aliaksandr Druz, Kong, W.-P., Thomas, P., Yang, Y., Foulds, K. E., Todd, J.-P. M., & Wei, H. (2018). Structure-based design of a quadrivalent fusion glycoprotein vaccine for human parainfluenza virus types 1–4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(48), 12265–12270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811980115>

Han, J. Y., Suh, W., & Han, S. B. (2022). Seasonal epidemiological and clinical characteristics of pediatric patients with human parainfluenza virus infection by serotype: a retrospective study. *Virology Journal*, 19(1).
<https://doi.org/10.1186/s12985-022-01875-2>

Hasman, H., Pachucki, C. T., Unal, A., Nguyen, D., Devlin, T., Peeples, M. E., & Kwilas, S. A. (2009). Aetiology of influenza-like illness in adults includes

parainfluenzavirus type 4. *Journal of Medical Microbiology*, 58(4), 408–413.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.006098-0>

Hause, B. M., Nelson, E., & Christopher-Hennings, J. (2021). *Eptesicus fuscus* Orthorubulavirus, a Close Relative of Human Parainfluenza Virus 4, Discovered in a Bat in South Dakota. *Microbiology Spectrum*, 9(2).
<https://doi.org/10.1128/spectrum.00930-21>

Hayati Beka, Ayşe Kılıç, Emin Ünüvar, Mustafa Önel, Fatma Oğuz, Müjgan Sıdal, Seyhan Selvi Aslan, Emel Bozkaya, Selim Badur, & Ağaçfidan, A. (2012). Frequency of Common Viruses in Etiology of Acute Respiratory Tract Infections. *Indian Journal of Pediatrics*, 80(2), 91–96. <https://doi.org/10.1007/s12098-012-0880-z>

Henrickson, K. J. (2003). Parainfluenza Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 242–264. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.2.242-264.2003>

Herrmann, E. C., & Hable, K. A. (1970). Experiences in laboratory diagnosis of parainfluenza viruses in routine medical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 45(3), 177–188. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4314185/>

Johnson, K. M., Chanock, R. M., Cook, M. K., Huebner, R. J., Chi, L., Wong, D., & Turner, H. C. (1960). Studies Of A New Human Hemadsorption Virus. *American Journal of Epidemiology*, 71(1), 81–92.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120092>

Knipe, D. M., Howley, P. M., & Griffin, D. E. (2001). *Fundamental virology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Komada, H., Kawano, M., Uefuji, A., Ito, M., Tsurudome, M., Hatakeyama, E., Nakanishi, M., Sakue, S., Joh, C., Suzumura, E., Tamaki, T., Tomioka, T., Nishio, M., Tsumura, H., Uematsu, J., Yamamoto, H., O'Brien, M., Bando, H., & Ito, Y. (2010). Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus types 4A and 4B: sequence analysis of the large protein genes and gene start, intergenic and end sequences. *Archives of Virology*, 156(1), 161–166.
<https://doi.org/10.1007/s00705-010-0834-6>

Kumar, D., Erdman, D. D., Shaf Keshavjee, Teresa, Tellier, R., Hadjiliadis, D., Johnson, G., Ayers, M., Siegal, D., & Atul Humar. (2005). Clinical Impact of Community-Acquired Respiratory Viruses on Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplant. *American Journal of Transplantation*, 5(8), 2031–2036. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00971.x>

Kumar S., Stecher G. y Tamura K. (2016). MEGA7: Análisis de Genética Evolutiva Molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. *Biología Molecular y Evolución* 33:1870-1874.

Lamb, R. A., & Parks, G. D. (2007). Paramyxoviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology: Fifth Edition*, 1449–1496. <https://www.scholars.northwestern.edu/en/publications/paramyxoviridae-the-viruses-and-their-replication-2>

Lau, S. K. P., Li, K. S. M., Chau, K. ., So, L. ., Lee, R. A., Lau, Y. ., Chan, K. ., Lim, W. W. L., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. . (2009). Clinical and Molecular Epidemiology of Human Parainfluenza Virus 4 Infections in Hong Kong: Subtype 4B as Common as Subtype 4A. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1549–1552. <https://doi.org/10.1128/jcm.00047-09>

Lau, S. K. P., To, W., Tse, P. W. T., Chan, A. K. H., Woo, P. C. Y., Tsoi, H., Leung, A. F. Y., Li, K. S. M., Chan, P. K. S., Lim, W. W. L., Yung, R. W. H., Chan, K., & Yuen, K. (2005). Human Parainfluenza Virus 4 Outbreak and the Role of Diagnostic Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4515–4521. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.9.4515-4521.2005>

Lednicky, J. A., Waltzek, T. B., Halpern, M. D., & Hamilton, S. B. (2012). Comparative Analysis of the Full-Length Genome Sequence of a Clinical Isolate of Human Parainfluenza Virus 4B. *Scientifica*, 2012, 1–4. <https://doi.org/10.6064/2012/871201>

Lindquist, S. W., Darnule, A., Istas, A., & Demmler, G. J. (1997). Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 16(1), 34–38. <https://doi.org/10.1097/00006454-199701000-00008>

Linster, M., Do, L. A. H., Minh, N. N. Q., Chen, Y., Zhe, Z., Tuan, T. A., Tuan, H. M., Su, Y. C. F., van Doorn, H. R., Moorthy, M., & Smith, G. J. D. (2018). Clinical and Molecular Epidemiology of Human Parainfluenza Viruses 1–4 in Children from Viet Nam. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24767-4>

Liu, W.-K., Liu, Q., Chen, D.-H., Liang, H.-X., Chen, X.-K., Huang, W.-B., Qin, S., Yang, Z.-F., & Zhou, R. (2013). Epidemiology and clinical presentation of the four human parainfluenza virus types. *BMC Infectious Diseases*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-28>

Marcink, T. C., Englund, J. A., & Moscona, A. (2022). Paramyxoviruses: Parainfluenza Viruses. Springer eBooks, 1–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9544-8_25-1

Nei, M. y Kumar, S. (2000). *Evolución Molecular y Filogenética*. Oxford University Press, Nueva York.

Nishio, M., Masato Tsurudome, Ito, M., & Ito, Y. (2005). Human Parainfluenza Virus Type 4 Is Incapable of Evading the Interferon-Induced Antiviral Effect. *Journal of Virology*, 79(23), 14756–14768. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.23.14756-14768.2005>

Oda, K., Nishimura, H., Watanabe, O., Kubo, T., & Shindo, S. (2018). A case report on parainfluenza virus type 4a infection in a 1-year-old boy with biphasic fever. *Journal of Thoracic Disease*, 10(S9), S2305–S2308. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.05.159>

Oh, D.-Y., Biere, B., Grenz, M., Wolff, T., Schweiger, B., Dürrwald, R., & Reiche, J. (2021). Virological Surveillance and Molecular Characterization of Human Parainfluenzavirus Infection in Children with Acute Respiratory Illness: Germany, 2015–2019. *Microorganisms*, 9(7), 1508. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071508>

Pan, Y., Zhang, Y., Shi, W., Peng, X., Cui, S., Zhang, D., Lu, G., Liu, Y., Wu, S., Yang, P., & Wang, Q. (2017). Human parainfluenza virus infection in severe acute respiratory infection cases in Beijing, 2014-2016: A molecular epidemiological study.

Influenza and Other Respiratory Viruses, 11(6), 564–568.
<https://doi.org/10.1111/irv.12514>

Park, K. S., Yang, M. H., Lee, C. K., & Song, K.-J. (2014). Genetic analysis of human parainfluenza viruses circulating in Korea, 2006. *Journal of Medical Virology*, 86(6), 1041–1047. <https://doi.org/10.1002/jmv.23890>

Ren, L., Gonzalez, R., Xie, Z., Xiong, Z., Liu, C., Xiang, Z., Xiao, Y., Li, Y., Zhou, H., Li, J., Yang, Q., Zhang, J., Chen, L., Wang, W., Vernet, G., Paranhos-Baccalà, G., Shen, K., & Wang, J. (2011). Human parainfluenza virus type 4 infection in Chinese children with lower respiratory tract infections: A comparison study. *Journal of Clinical Virology*, 51(3), 209–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.05.001>

Rubin, E. E., Quennec, P., & McDonald, J. C. (1993). Infections Due to Parainfluenza Virus Type 4 in Children. *Clinical Infectious Diseases*, 17(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1093/clinids/17.6.998>

Schomacker, H., Schaap-Nutt, A., Collins, P. L., & Schmidt, A. C. (2012). Pathogenesis of acute respiratory illness caused by human parainfluenza viruses. *Current Opinion in Virology*, 2(3), 294–299. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.02.001>

Shao, N., Liu, B., Xiao, Y., Wang, X., Ren, L., Dong, J., Sun, L., Zhu, Y., Zhang, T., & Yang, F. (2021). Genetic Characteristics of Human Parainfluenza Virus Types 1–4 From Patients With Clinical Respiratory Tract Infection in China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679246>

Sugimoto, S., Kume, Y., Suwa, R., Kawase, M., Kakizaki, M., Egawa, K., Ono, T., Chishiki, M., Okabe, H., Norito, S., Sato, M., Sakuma, H., Suzuki, S., Hosoya, M., Takeda, M., Hashimoto, K., & Shirato, K. (2022). Ten Nearly Complete Genome Sequences of Human Orthorubulavirus 4 Isolated from Pediatric Inpatients in Fukushima, Japan. *Microbiology Resource Announcements*, 11(7). <https://doi.org/10.1128/mra.00411-22>

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Beersma, M. F. C., Kroes, A. C. M., & Claas, E. C. J. (2004). Rapid and Sensitive Method Using Multiplex Real-Time PCR for Diagnosis of Infections by Influenza A and Influenza B Viruses, Respiratory Syncytial Virus, and Parainfluenza Viruses 1, 2, 3, and 4. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1564–1569. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1564-1569.2004>

Thomazelli, L. M., Oliveira, D. B. L. de, Durigon, G. S., Whitaker, B., Kamili, S., Berezin, E. N., & Durigon, E. L. (2018). Human parainfluenza virus surveillance in pediatric patients with lower respiratory tract infections: a special view of parainfluenza type 4. *Jornal de Pediatria*, 94(5), 554–558. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.07.017>

Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L. (1969). Studies on Parainfluenza Type 2 and 4 Viruses Obtained from Patients with Common Colds. *BMJ*, 1(5642), 471–474. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5642.471>

Vachon, M.-L., Dionne, N., Leblanc, E., Moisan, D., Bergeron, M., & Boivin, G. (2006). Human Parainfluenza Type 4 Infections, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 12(11), 1755–1758. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060196>

Vainionpää, R., & Hyypiä, T. (1994). Biology of parainfluenza viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(2), 265–275. <https://doi.org/10.1128/cmr.7.2.265>

Villaran, M. V., García, J., Gomez, J., Arango, A. E., Gonzales, M., Chicaiza, W., Alemán, W., Lorenzana de Rivera, I., Sanchez, F., Aguayo, N., Kochel, T. J., & Halsey, E. S. (2013). Human parainfluenza virus in patients with influenza-like illness from Central and South America during 2006-2010. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 8(2), 217–227. <https://doi.org/10.1111/irv.12211>

Wang, C. Y. T., Arden, K. E., Greer, R., Sloots, T. P., & Mackay, I. M. (2012). A novel duplex real-time PCR for HPIV-4 detects co-circulation of both viral subtypes among ill children during 2008. *Journal of Clinical Virology*, 54(1), 83–85. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.013>

Xiao, N., Duan, Z., Xie, Z., Zhong, L., Zeng, S., Huang, H., Gao, H., & Zhang, B. (2016). Human parainfluenza virus types 1-4 in hospitalized children with acute lower respiratory infections in China. *Journal of Medical Virology*, 88(12), 2085–2091. <https://doi.org/10.1002/jmv.24580>

Yano, T., Miwa Fukuta, Maeda, C., Shigehiro Akachi, Matsuno, Y., Motoko Yamadera, Kobayashi, A., Nagai, Y., Hajime Kusahara, Kobayashi, T., Amano, H., Takamichi Nishinaka, Ochiai, H., Watanabe, M., Nakamura, H., Suga, S., & Ihara, T. (2014). Epidemiological Investigation and Seroprevalence of Human Parainfluenza Virus in Mie Prefecture in Japan during 2009–2013. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 67(6), 506–508. <https://doi.org/10.7883/yoken.67.506>

Yea, C., Cheung, R., Collins, C., Adachi, D., Nishikawa, J., & Tellier, R. (2009). The Complete Sequence of a Human Parainfluenzavirus 4 Genome. *Viruses*, 1(1), 26–41. <https://doi.org/10.3390/v1010026>

Zhao, H., Harris, R. J., Ellis, J., Donati, M., & Pebody, R. G. (2017). Epidemiology of parainfluenza infection in England and Wales, 1998–2013: any evidence of change? *Epidemiology and Infection*, 145(6), 1210–1220. <https://doi.org/10.1017/s095026881600323x>

Zhou, S., Mao, N., Zhang, Y., Cui, A., Zhu, Z., Hu, R., Xu, J., & Xu, W. (2021). Genetic analysis of human parainfluenza virus type 4 associated with severe acute respiratory infection in children in Luohe City, Henan Province, China, during 2017–2018. *Archives of Virology*, 166(9), 2585–2590. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05154-3>